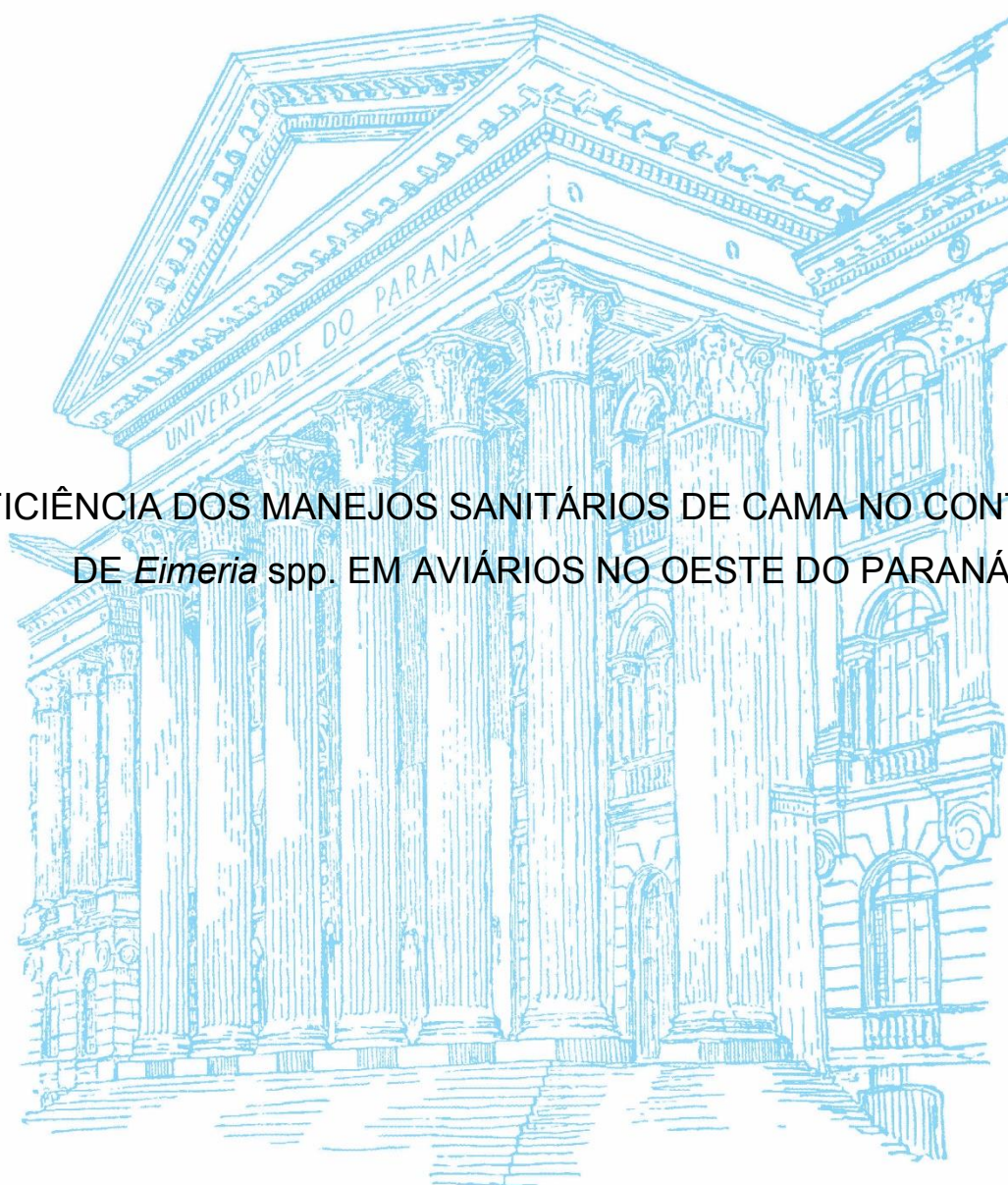


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ LUIS VRIESMAN BENINCA

EFICIÊNCIA DOS MANEJOS SANITÁRIOS DE CAMA NO CONTROLE
DE *Eimeria* spp. EM AVIÁRIOS NO OESTE DO PARANÁ



PALOTINA

2020

ANDRÉ LUIS VRIESMAN BENINCA

EFICIÊNCIA DOS MANEJOS SANITÁRIOS DE CAMA NO CONTROLE
DE *Eimeria* spp. EM AVIÁRIOS NO OESTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor de
Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B467 Beninca, André Luis Vriesman
Eficiência dos manejos sanitários de cama no controle de
Eimeria spp. em aviários no oeste do Paraná / André Luis Vries-
man Beninca – Palotina, 2020.
69f.

Orientador: Nelson Luis Mello Fernandes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. *Eimeria spp.* 2. Sanidade. 3. Fermentação. 4. Calagem. 5.
Multiplex PCR. I. Fernandes, Nelson Luis Mello. II. Universi-
dade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRÉ LUIS VRIESMAN BENINCA** intitulada: **"EFICIÊNCIA DOS MANEJOS SANITÁRIOS DE CAMA NO CONTROLE DE *Eimeria* spp. EM AVIÁRIOS NO OESTE DO PARANÁ.**, sob orientação do Prof. Dr. NELSON LUIS MELLO FERNANDES, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 16 de Julho de 2020.

Assinatura Eletrônica

21/07/2020 14:51:20.0

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/07/2020 16:25:55.0

ANTONIO CARLOS PEDROSO

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE)

Assinatura Eletrônica

30/07/2020 11:22:43.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*A toda minha família e aos amigos, que
sempre mantiveram a sua fé e confiança
em mim.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por todas as oportunidades de todos os dias continuar em frente.

Aos meus pais, Venilton e Magali, pela excelente educação, pelo lar fraterno e por estarem comigo nos momentos de alegria e de dificuldade. Aos meus irmãos Lincoln e Davi (*in memoriam*), pela amizade, companheirismo e por participarem da minha formação enquanto indivíduo, à cunhada Camila e sobrinho Davi.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes pelos ensinamentos, dedicação e por toda a confiança depositada em mim.

A toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do Animais, Thaís, Carolina, Ana Paula, Laura, Ana Gottems, Victória, Ana Júlia e Jhonatan.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina e seus colaboradores, por promoverem o programa e possibilitarem o meu aperfeiçoamento e a inserção da rotina de pesquisa científica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos, Alessandro, Felipe, Giovane, Ricardo, Lucas, César, Gabriel, Ítalo e Paulo por me apoiarem a todo momento.

Agradeço.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência dos manejos sanitários aplicados à cama de aviários comerciais para o controle da Salmonelose nas criações de frango de corte de uma Cooperativa na região Oeste do Paraná e verificar seu efeito no controle da coccidiose. Foram selecionados três tratamentos de cama, propostos pela empresa: a fermentação associada a calagem (T1); calagem (T2) e a fermentação (T3). As amostras de fezes foram colhidas de 18 aviários, com um delineamento experimental inteiramente casualizado testando-se diferentes áreas de coleta, sendo, no início, próximo às placas evaporativas (P1); no meio do galpão (P2) e no final, próximo aos exaustores (P3). As coletas foram realizadas a partir do 5º dia do alojamento e se repetiram semanalmente até o 40º dia, durante cinco lotes sucessivos. A incidência da parasitose foi determinada pela contagem de oocistos nas fezes, testando as interações entre tratamento, idade das aves e número de lotes alojados. Amostras com elevada contagem de oocistos, foram selecionadas para identificar as espécies de *Eimeria* spp. circulantes no galpão, através do Multiplex PCR. Observou-se que o tratamento 3 foi significativamente ($p < 0,05$) mais eficiente que os demais pela redução significativa de OOPG comparando-se o mesmo lote ao longo de todos observados, o que também pode contribuir para menor custo de produção com menor necessidade de mão-de-obra para execução do manejo sanitário. A utilização da técnica de PCR Multiplex, precisa ser padronizada para amostras de campo, afim de se determinar as espécies de *Eimeria* spp. disseminadas no plantel.

Palavras-chave: *Eimeria* spp., sanidade, fermentação, calagem, Multiplex PCR.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the efficiency of sanitary management applied to commercial poultry litter for the control of Salmonellosis in broiler chicken farms in Western Paraná and to verify its effect on coccidiosis control. Three litter treatments, proposed by the company, were selected: fermentation associated with liming (treatment 1); liming (treatment 2) and fermentation (treatment 3). The samples were collected from 18 aviaries, with a completely randomized experimental design, testing different collection areas, being, at the beginning, close to the evaporative plates (point 1); in the middle of the shed (point 2) and at the end, close to the exhaust fans (point 3). The collections were carried out from the 5th day of the accommodation and were repeated weekly until the 40th day, during five successive lots. The incidence of parasitosis was determined by counting oocysts in feces, testing for interactions between treatment, age of birds and number of flocks housed. Samples with high oocyst count were selected to identify the species of *Eimeria* spp. circulating in the shed, through the Multiplex PCR. It was observed that treatment 3 was significantly ($p \leq 0.05$) more efficient than the others, observed due to significantly reduction of OOPG compared to the same lot and along all the others observed which can also contribute to lower production costs with less need for labor to perform sanitary management. The use of the Multiplex PCR technique, needs to be standardized for field samples, in order to determine the species of *Eimeria* spp. disseminated in the squad.

Keywords: *Eimeria* spp., sanity, fermentation, virgin lime, Multiplex PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PONTOS DE COLETA DAS EXCRETAS DAS AVES NOS AVIÁRIOS ..	36
FIGURA 2 - COMPORTAMENTO DA EXCREÇÃO DE OOCISTO DE EIMERIA SPP. POR FRANGOS DE CORTE, ALOJADOS SOBRE CAMAS SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE TRATAMENTO EM AVIÁRIOS COMERCIAIS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	433
FIGURA 3 - COMPORTAMENTO DA EXCREÇÃO DE OOCISTO DE EIMERIA SPP. POR FRANGOS DE CORTE, ALOJADOS SOBRE CAMAS SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE TRATAMENTO EM AVIÁRIOS COMERCIAIS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ.....	477
FIGURA 4 - ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DE OOCISTOS DE EIMERIA SPP. EM DIFERENTES TRATAMENTOS DA CAMA DE ACORDO COM A IDADE DAS AVES POR LOTES SUBSEQUENTES.	49
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO DESEMPENHO DOS LOTES DE ACORDO COMA IDADE PARA CADA TRATAMENTO PROPOSTO; TRATAMENTO 1 (A), TRATAMENTO 2 (B) E TRATAMENTO 3 (C). ...	50
FIGURA 6 - CONTAGEM DE OOPG MÉDIO PARA OS PONTOS DE COLETA ESTABELECIDOS	522
FIGURA 7- AMOSTRA DE CAMPO APÓS CENTRIFUGAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DO DNA (A) E OOCISTOS ESPORULADOS OBTIDOS A PARTIR DA PURIFICAÇÃO DA VACINA COMERCIAL BIOCOCCIVET R (BIOVET®) (B).	544
FIGURA 8 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,5% DAS REAÇÕES INDIVIDUAIS E DE PCR-MULTIPLEX, PARA O CONTROLE POSITIVO, PROPOSTO PARA A DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DE EIMERIA SPP.....	555
FIGURA 9 - PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE EIMERIA SPP COM DNA VACINAL.	566
FIGURA 10 - REAÇÃO DE PCR CONFIGURADO COM AUMENTO DO VOLUME DE AMOSTRA EM GEL DE AGAROSE À 2,5% EM AMOSTRAS COM ALTA CONTAGEM DE OOPG.	577

FIGURA 11 - REAÇÃO DE PCR CONFIGURADO COM AUMENTO DO VOLUME DE AMOSTRA EM GEL DE AGAROSE À 2,5% PARA REAÇÃO COM VOLUME FINAL DE 50 µL.	588
FIGURA 12 - REAÇÃO DE PCR PARA GENÔMICO RDNA 16S (1500 PB) EM AGAROSE A 1,6%.	59
FIGURA 13 - REAÇÃO DE PCR PARA PROCESSO DE PURIFICAÇÃO MODIFICADA DE AMOSTRAS COLETADAS.	600

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO PCR MULTIPLEX, TAMANHO DOS AMPLICONS, CONCENTRAÇÃO E TEMPERATURA DE ANELAMENTO	41
TABELA 2 - EFEITOS AVALIADOS NA CRIAÇÃO DE AVES DE CORTE E A SUA INTERAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DE EIMERIA SPP, EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....	42
TABELA 3 - VALOR MÉDIO DE OOPG EM FEZES DE AVES COLETADAS DE AVIÁRIOS COMERCIAIS EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES TRATAMENTOS USADOS NAS CAMAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA -	Associação Brasileira de Proteína Animal
EMBRAPA -	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO -	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
PAMPs -	Padrão de Reconhecimento de Patógeno
TLR -	Receptores Tool-Like
NK -	Células Natural Killer
WFB -	Wall-forming body
TH1 -	Célula T-auxiliadora do tipo 1
TH2 -	Célula T-auxiliadora do tipo 2
TCD4 -	Célula T citotóxica do tipo 4
TCD8 -	Célula T citotóxica do tipo 8
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
rDNA -	Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
spp. -	Espécies
sp. -	Espécie
ITS-1 -	Espaçador transcrito interno
CV -	Conversão Alimentar
OIE -	Organização Mundial de Saúde Animal
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
DAS -	Secretaria de Defesa Agropecuária
SDSA -	Serviço de Defesa Sanitária Animal
PNSA -	Programa Nacional de Sanidade Avícola
BPP -	Boas Práticas de Produção
NH ₃ -	Gás Amônia
OOPG -	Oocistos por gramas de fezes
CONCEA -	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
pH -	Potencial Hidrogeniônico
O ₂ -	Gás Oxigênio
NaCl -	Cloreto de Sódio
TRIS -	Tampão Hidroximetilaminometano
HCl -	Ácido Clorídrico

EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
NaClO -	Hipoclorito de Sódio
Taq -	<i>Termophilus aquaticus</i>
pb -	Pares de base
DOPA –	Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais

LISTA DE SÍMBOLOS

μm –	Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$ –	Graus Célsius
γ –	Gama
% -	Porcentagem
& -	e comercial
® -	Marca registrada
Kg –	Quilogramas
m^2 -	Metros quadrados
g –	Gramas
P1 –	Ponto 1
P2 –	Ponto 2
P3 –	Ponto 3
G –	Força Gravitacional
ml–	Mililitros
min –	Minutos
μL –	Microlitros
M –	Molar
mM –	Milimolar
mg –	Miligramas
GL –	Gay-Lussac
μM -	Micromolar
pmol -	Picomolar
T1-	Tratamento 1
T2-	Tratamento 2
T3-	Tratamento 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivos Específicos	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 A <i>Eimeria</i> spp.	19
2.1.1 Ciclo Evolutivo	20
2.1.2 Patogenia e sinais clínicos	21
2.1.3 Métodos de Diagnóstico	23
2.1.4 Controle da Coccidiose	25
2.1.5 <i>Eimeria</i> como agente predisponente a infecções secundárias	25
2.1.6 Tratamentos alternativos e vacinas no controle de <i>Eimeria</i> spp	27
2.1.7 Ambiência e biossegurança	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 LOCAL	33
3.2 MATERIAL DA CAMA	33
3.3 TRATAMENTOS AVALIADOS E PROCEDIMENTO DE COLETA	34
3.4 MÉTODO ANALÍTICO	37
3.5 OBTENÇÃO DE CONTROLE POSITIVO PARA AS REAÇÕES MOLECULARES	37
3.6 CLARIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
3.7.1 Dados de OOPG	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÃO	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7. REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade de grande importância na economia mundial que demanda grande aporte financeiro, tecnológico, estrutural e de recursos humanos, tem rápida evolução e produz alimento de baixo custo, tornando-a altamente atrativa. Em 2019, a produção de carne de aves já esteve mais próxima da suína, com estimativa para ultrapassá-la em 2020, devido ao triênio 2017/19 que proporcionou rápido crescimento, impulsionado pelas barreiras dos mercados importadores como os países integrantes da União Europeia (SANTOS FILHO et al. 2019).

A produção de carne de aves é uma das principais atividades pecuárias praticadas no mundo e o Brasil está entre um dos expoentes deste mercado. Segundo relatório da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o mercado brasileiro é o maior exportador de carne de aves do mundo, sendo que no ano de 2019 exportou 4.214 mil toneladas de carne e produtos industrializados. Na produção, está em terceiro lugar com 13.245 mil toneladas atrás dos Estados Unidos e da China, respectivamente, o consumo per capita é de 42kg/ano (ABPA, 2020).

O Estado do Paraná está posicionado como o maior produtor de carne de aves com 35,47% da produção total, sendo que 37,51% da produção é destinada ao mercado externo atendendo principalmente países do Oriente Médio ofertando aves inteiras, cortes, industrializados ou carnes salgadas.

Sendo uma cadeia cada vez mais representativa no cenário econômico brasileiro e mundial, a produção avícola adquiriu perfil de produção em larga escala, visto que necessita de insumos para a ração como milho e soja, medicamentos, vacinas, infraestrutura de incubatórios, matrizeiros, abatedouros, indústria farmacêutica veterinária, logística, órgãos reguladores e mão de obra. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2018) produziu um artigo em seu Anuário de destacando a importância da avicultura para o Brasil e ressalta o seu papel social que envolve direta e indiretamente 4 milhões de pessoas, entre produtores, empresas e técnicos sustentados pela cadeia da carne e ovos de aves, seus produtos e subprodutos, tanto pelo mercado interno quanto externo.

Desta forma, os aspectos sanitários da cadeia produtiva destacam-se cada vez mais como um importante avanço no controle e prevenção de doenças. A criação de aves de corte ocorre em galpões com microambiente totalmente controlado,

minimizando cada vez mais a exposição aos agentes infecciosos. No entanto, como as aves são criadas em alta densidade durante todo o seu ciclo produtivo, torna-se fator que favorece à ocorrência de doenças e emergência de novos patógenos infecciosos e parasitários (PEEK e LANDMAN, 2011). A atenção aos aspectos sanitários é imprescindível em tempos onde os mercados importadores, impõe barreiras sanitárias cada vez mais restritas para a importação de alimentos. Um melhor entendimento do comportamento epidemiológico das doenças nestas situações é fundamental para que estratégias mais eficientes sejam tomadas.

Um dos grandes desafios de ordem sanitária a serem enfrentados que ainda precisa ser discutido é a coccidiose. A cooccidiose é uma doença provocada pela *Eimeria* spp, protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo *Apicomplexa*, causador de doença entérica (KAWAZOE et al. 2009). Seus oocistos são eliminados com as excretas das aves que podem infectar outras aves pela ingestão dos oocistos esporulados no ambiente. A sua manifestação pode ser subclínica ou clínica, sendo esta última menos comum. Para Zhang et al. (2013), as infecções clínicas representam 5% dos casos apresentando sinais entéricos como: diarreia, excretas sanguinolentas, apatia, oligodipsia e inapetência, enquanto as infecções subclínicas representam 20%, sendo o maior responsável por perdas na produtividade da ave. É uma doença que causa grande impacto financeiro na atividade (GAZONI et al. 2020).

É de grande valia destacar a importância da coccidiose como fator predisponente para a manifestação de outras doenças, principalmente as causadas por bactérias entéricas. Trabalhos destacam o papel da *Eimeria* spp. que torna o ambiente intestinal mais favorável à multiplicação de outros patógenos em caso de infecções massivas (ARAKAWA et al. 1981; MACDONALD et al. 2019).

Considerado como importante agente dentro de um ambiente de criação, o protozoário tem características de ter rápida taxa de multiplicação e ser de difícil controle. Adotar estratégias que reduzam tanto o contato das aves com o agente, como também o uso excessivo de medicamentos para seu controle, diminuirá os riscos de indução de resistência dentro dos sistemas produtivos. A cada ano, fomenta-se cada vez mais a ideia da produção de animais livres de fármacos (CHAPMAN, 1990).

Neste sentido, as ideias de saúde pública e saúde única reforçam a necessidade de reduzir cada vez mais o uso de fármacos, visto que muitas das medicações usadas na produção também são utilizadas na medicina humana, e o seu

emprego precisa ser reduzido para que se preservem moléculas efetivas para uso humano sem que ocorra resistência. A ocorrência de resistência para *Eimeria* spp. já foi avaliado por Chapman, (1997), o que pode acarretar na resistência de espécies que infectem seres humanos acarretando em problemas ainda maiores. Entidades internacionais como a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) em 2004 produziram um *workshop*, tratando da restrição do uso de promotores de crescimento usados no controle de agentes infecciosos presentes na produção, logo é imperativo o desenvolvimento de novas estratégias de controle com finalidade de mitigar os casos de patologias de ordem infecciosa.

O ambiente pelos quais as aves passam durante todo o período produtivo surge como um importante alicerce na manutenção de um status sanitário. A manifestação de doenças de ordem infecciosa se divide em três fatores: hospedeiro, agente infeccioso e ambiente. Um hospedeiro hígido é mais resistente ao desenvolvimento de doenças, quando o sistema imunológico está prontamente disponível para debelar uma infecção, seja por ter sido submetido a imunização, transferência de imunidade passiva ou contato anterior. O agente infeccioso, por vezes necessita de condições específicas para sua permanência dentro de um sistema, assim adoção de medidas de biossegurança que minimizem o risco de contaminação são de importância significativa. O ambiente é o fator que possibilita o contato entre o agente e hospedeiro, certamente onde as novas estratégias de controle surgirão. O uso de barreiras sanitárias, sanitizantes, controle de temperatura e condição de umidade estão entre as estratégias utilizadas neste segmento (EMBRAPA, 2003).

No conceito de sanidade dentro de uma produção, a ambiência é fundamental no que se trata de condição ideal para controle de agente infecciosos. A avicultura de corte brasileira adota um modelo de criação intensiva, em ambiente de temperatura, umidade e ventilação controlados, junto da nutrição balanceada e do aperfeiçoamento genético dos plantéis portanto produzem animais de rápido crescimento, contudo a produção intensiva facilita a ocorrência de doenças nos plantéis devido ao aumento da densidade de animais e estresse provocados pelo confinamento, situação que predispõe a manifestação de agentes patogênicos (BERCHIERI et al. 2009).

A cama é um dos principais elementos a serem considerados quando se trata de controle sanitário. Sua função é separar os animais do piso das instalações proporcionando maior conforto térmico, redução das lesões na carcaça e absorção da

umidade e de excretas produzidas pelos animais (Hernandes & Cazetta, 2001). Dentre os produtos disponíveis no mercado, a maravalha é amplamente utilizada (Avila et al. 2007). A boa capacidade de absorção de umidade, consequentemente, redução da produção de gases como a amônia são pontos positivos (RITZ et al. 2009). Contudo a cama não está livre de contaminantes, que são inerentes a avicultura de corte durante o seu uso, para isso podem ser adotados manejos no período de vazio sanitário para o controle de microrganismos diminuindo a fonte de substratos para seu desenvolvimento.

O controle de contaminantes biológicos pode ser realizada pelo método de fermentação como previsto na Instrução Normativa nº 56, de 04 de Dezembro de 2007 (BRASIL, 2007), ou através da incorporação de cal e manejo subsequente. As diversas estratégias podem apresentar resultados diferentes e assim determinar o método mais eficiente, também para o controle de *Eimeria* spp.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi determinar se os manejos sanitários aplicados nas camas dos aviários comerciais são eficazes para o controle de *Eimeria* spp.

1.1.1 Objetivos Específicos

Determinar o número de oocistos por grama de fezes (OOPG) como forma de avaliação entre os métodos propostos para sanitização da cama.

Determinar se há diferença de distribuição de *Eimeria* spp. dentro de um mesmo aviário, para cada tratamento.

Detectar as espécies de *Eimeria* spp. presentes nos aviários estudados, através da padronização da técnica da Multiplex PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A *Eimeria* spp.

Eimeria spp. são protozoários do Filo *Apicomplexa*, do gênero *Eimeria*, proposto inicialmente por Schneider em 1875, pertencentes à classe Coccidia. Estão disseminados mundialmente com grande variedade de hospedeiros, incluindo diversos mamíferos, aves e lagomorfos. Nas aves causam a coccidiose, doença com sinais entéricos de grau variável conforme a susceptibilidade do hospedeiro, idade, estado nutricional e sanitário

São sete espécies reconhecidamente patogênicas para as aves: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. maxima* de caráter espécie-específico das galinhas (URQUHART, et al.1996).

Por ser uma doença disseminada mundialmente e em praticamente todos os plantéis de aves de corte, é considerada uma doença de grande morbidade, mas de baixa mortalidade. Talvez o que torne a *Eimeria* spp. um dos agentes mais importante do ponto de vista sanitário, é que quando ocorre a coccidiose aumentam as chances de ocorrer processos infecciosos secundários. Já foram encontrados resultados que comprovem essa afirmação como no caso da *Salmonella* Tiphymurium, *Campylobacter* e *Clostridium perfringens* (MACDONALD et al. 2019; RIMET et al. 2019; ADHIKARI et al. 2020).

2.1.1 Ciclo Evolutivo

Os oocistos não-esporulados, são constituídos de uma massa protoplasmática nucleada envolta por uma parede resistente e são eliminados nas fezes, que passam a ser esporulados em temperatura média de 30°C, umidade elevada e presença de oxigênio, a esporulação ocorre entre um e dois dias (ALLEN & FETTERER, 2002; MORRIS & GASSER, 2006).

Conforme Urquhart et al. (1996), as espécies de *Eimeria* possuem predileção por segmentos específicos do trato gastrointestinal das aves para o desenvolvimento do seu ciclo. A *E. acervulina* afeta a parte superior do intestino delgado, formando faixas transversais e brancas; *E. maxima* localiza-se na porção média do intestino delgado, provocando espessamento intestinal e formação de exsudato rosáceo; *E. mitis* e *E. brunetti* ocupam o terço final do intestino delgado, sendo que a primeira não forma lesões visíveis, enquanto a *E. brunetti* promove focos hemorrágicos e necrose coagulativa. *E. tenella* e *E. necatrix* são as mais patogênicas, a primeira situada,

principalmente, no ceco promovendo hemorragia e focos necróticos no tecido e a segunda, provoca lesões macroscópicas semelhantes a *E. tenella*.

Os indivíduos do gênero *Eimeria* possuem ciclo monoxênico e duas fases reprodutivas assexuadas e uma sexuada. O início do ciclo se dá pela ingestão de oocistos na fase infectante. Os oocistos ingeridos são rompidos por ação mecânica da moela das aves contra as partículas de alimento e segue o movimento peristáltico junto ao bolo alimentar. Ao atingir o intestino delgado, ocorre a liberação de sais biliares e tripsina e consequente ruptura dos esporocistos, liberando os esporozoítos, etapa denominada de excistação na luz intestinal, que migram em direção aos enterócitos e lâmina própria.

A próxima etapa é a diferenciação em esquizonte, por reprodução assexuada (fissão múltipla), que após o amadurecimento se transformam em merontes, processo chamado de merogonia, e são liberados na luz intestinal para invasão de uma nova celular do epitélio intestinal, este processo pode se repetir mais de uma vez. Após a merogonia, os esquizontes se diferenciam em macrogametócitos ou microgametócitos, sendo este composto de células flageladas dotadas de movimento, os quais migram até os macrogametas, sendo capaz de fecundá-los e produzir zigotos, ou os denominados oocistos não esporulados, que podem ser visualizados nas fezes ou através de raspado de mucosa intestinal, segundo Kim et al. (2019) o período pré-patente dura entre quatro e sete dias.

Após a liberação dos oocistos, não esporulados, no ambiente, se inicia um novo ciclo. Para que um ciclo se feche são necessários de quatro a seis dias para a esporulação, em condições ideais de temperatura e umidade.

2.1.2 Patogenia e sinais clínicos

A ocorrência ou não de sinais clínicos é variável, e depende das espécies ingeridas, quantidade de oocistos infectantes esporulados ingeridos pelas aves e que seriam capazes de promover a doença. Conforme Urquhart et al. (1996), as espécies de *Eimeria* possuem predileção por segmentos específicos do trato gastrointestinal das aves para desenvolvimento do seu ciclo. *E. acervulina* afeta a parte superior do intestino delgado, formando faixas transversais e brancas, *E. maxima* localiza-se na porção média do intestino delgado, provocando espessamento intestinal e formação de exsudato rosáceo, *E. mitis* e *E. brunetti* estão no terço final do intestino delgado, a

primeira não forma lesões visíveis, enquanto *E. brunetti* promove focos hemorrágicos e necrose coagulativa. *E. tenella* e *E. necatrix* são as mais patogênicas, a primeira situada, principalmente, no ceco promovendo hemorragia e focos necróticos no tecido, a segunda provoca lesões macroscópicas semelhantes a *E. tenella*.

A *Eimeria* spp. gera alterações em mucosa intestinal, variando conforme a espécie, local e quantidade de oocistos ingeridos (URQUHART et al. 1996). Inicialmente ocorre resposta inflamatória à exposição de um grande número de esquizontes, dando início ao processo da resposta imunológica ao agente agressor. A resposta imune inata é ativada na presença de antígenos, que incluem os “padrões de reconhecimentos de patógenos” (PAMPs) e os *Toll-like receptors* (TLRs). Um dos principais ligantes, a profilina é expressa em grande quantidade pela *Eimeria*, provocando produção de citocinas pro-inflamatórias, desencadeando a proliferação de células inespecíficas de modo maciço, com a produção de células *Natural killer* (NK), heterófilos e macrófagos (KIM, et al. 2019). O principal antígeno do patógeno é uma estrutura de parede do agente, produzido por uma organela, o “wall-forming body” (WFB) tipo 2, apresentando grande similaridade ao *Cryptosporidium* sp. (WALLACH, 2007; KIM, et al. 2019).

A resposta adaptativa, desenvolve o papel mais importante da imunidade contra os protozoários com mediação linfócitos B e linfócitos T. Após a ativação da resposta humoral, inicia-se a ativação de resposta imune celular com fator de necrose tumoral- α , células *T-helper* (TH1 e TH2) produtores de citocinas e óxido nítrico, as quais induzem a morte dos parasitos por célula T-citotóxica tipo 4 e 8 (TCD4⁺ e TCD8⁺), células NK e macrófagos. Em caso de infecções subsequentes, células TCD4⁺ e TCD8⁺ são recrutadas ao sítio de infecção, sendo a primeira encontrada com níveis séricos mais significantes, evidenciando seu papel fundamental na depleção da infecção. Hong et al. (2006), avaliou o papel do interferon- γ nas galinhas infectadas com coccídios, e demonstrou capacidade de interromper a invasão dos enterócitos e interromper o ciclo reprodutivo da *Eimeria* spp. Estratégia de controle também usada pelo organismo é ativação de genes promotores de apoptose dos enterócitos mediada por linfócitos intraepiteliais de intestino, (KIM et al. 2019).

Doença entéricas comumente apresentam sinais clínicos semelhantes, sendo pouco usual estabelecer o agente causador da enfermidade. Os principais sinais clínicos, observados na coccidiose, são: crescimento retardado, apatia, diarreia

severa, oligodipsia, oligofagia, perda de peso, redução da produção de ovos, surtos de mortalidade.

Há casos evidenciando o potencial de coinfecção que a *Eimeria* spp. pode promover. Macdonald et al. (2019), evidenciaram que a infecção primária por *Eimeria* tenella promove aumento das lesões no ceco, causadas pela *Salmonella* Typhimurium. Rimet et al. (2019), ao estudarem o impacto da coinfecção de *Eimeria* e *Campylobacter*, concluíram que a replicação do protozoário aumenta significativamente as lesões provocadas pela bactéria pelo incremento no processo inflamatório, assim como Adhikari et al. (2020), descrevem o papel que o coccídio tem na ocorrência de enterite necrótica, causada pelo *Clostridium perfringens*. O processo se inicia com os estágios evolutivos da *Eimeria* que rompem os enterócitos promovendo intensa atividade mitótica um ambiente ideal a proliferação de bactérias do gênero.

2.1.3 Métodos de Diagnóstico

As metodologias para o diagnóstico da eimeriose incluem técnicas que vão desde avaliação morfológica das lesões nos órgãos até metodologias de biologia molecular.

A técnica mais difundida para diagnóstico de coccidiose a campo da ocorrência de coccidiose é pela avaliação das lesões provocadas pelo protozoário e pela avaliação de estruturas evolutivas do agente. Johnson & Reid, (1970) analisaram aves submetidas à necropsia e os segmentos intestinais e do ceco foram divulsionados e avaliados na sua luz quanto ao aspecto da lesão, sendo considerados: escarificações, coloração, espessura, integridade, focos hemorrágicos, sua extensão e local afetado. A interpretação se dá por um escore de lesão de 0 a 4, sendo 0 sem lesões significativas e 4 para o grau de lesão mais significativa, isto para cada espécie de protozoário. A desvantagem do diagnóstico por escore de lesão é impossibilitar o diagnóstico preciso de quais espécies estão presentes no processo infeccioso (LEE et al. 2006). Além disso, pode ser feito raspado da mucosa intestinal para observação do muco em microscopia de luz na magnificação de 100 vezes, com objetivo de se observar esquizontes, merozoitos ou ainda oocistos não esporulados.

O uso de programas que realizem diferenciação por morfometria também já foram estudados, Castañon et al. (2007) desenvolveram um programa (COCCIMORPH®) que realiza a diferenciação entre as espécies através da curvatura, geometria e textura dos oocistos. Contudo o acesso ao sistema e a *expertise* de manipulação do programa tornam o seu uso limitado.

Técnicas de microscopia com possibilidade de contagem manual de microrganismos a partir das excretas já foram difundidas e utilizadas como método laboratorial de maior precisão, entre elas a contagem de oocistos por grama de fezes por Gordon e Whitlock modificado (1939) também é amplamente difundida.

Outra opção com maior capacidade de diagnóstico, partindo de pequenas quantidades de material e com grande sensibilidade e especificidade são as técnicas moleculares de diagnóstico, dentre elas a reação de cadeia em polimerase (PCR). A técnica é baseada na amplificação de material genético, no caso ácido desoxirribonucleico (DNA), onde através de processos de purificação pelo qual se retiram impurezas da amostra; extração que é a etapa onde se rompem parede de oocistos e organelas permitindo que o material genético dos esporozoítos estejam expostos, e a amplificação de material genético, multiplicando-se exponencialmente a quantidade de ácido desoxirribonucleico ribossomal (rDNA) é possível determinar se o agente está presente, ou ainda, quais as espécies estão presentes na amostra (MORAES et al. 2015).

Schnitzler et al. (1998) realizaram o sequenciamento do DNA e identificaram regiões específicas da *Eimeria* spp. que são significativamente heterogêneas entre as espécies, o “*internal transcribed spacer*”, ou espaçador de transcrição interna (ITS-1), possibilitando que este fragmento seja utilizado para o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos.

Contudo, a evolução das espécies pode promover modificação na estrutura gênica, e com a *Eimeria* não foi diferente. Lew, et al. 2003 avaliaram a eficácia dos *primers* em cepas isoladas provenientes da Austrália, e chegaram à conclusão de que uma cepa pode ter variação na sequência ITS-1, o suficiente para que o *primer* não seja efetivo no diagnóstico. Para comprovar a diferença foi realizado o sequenciamento do gene nas espécies isoladas, e a sequência do gene ribossomal apresentou diferença.

O *primer* desenvolvido por Barta et al. (1998), usado no trabalho para *E. maxima* americana não amplificou os isolados de *E. maxima* isolado na Austrália,

porém para *E. mitis* mesmo apresentando significativa diferença no sequenciamento, todas agruparam dentro de uma mesma linhagem. Os autores apontam para uma possível diferença de material genético existente entre os esporocistos presentes num oocisto, que podem representar linhagens diferentes, devido ao grande número de cópias de rDNA e ainda sim pertencerem ao mesmo microorganismo.

2.1.4 Controle da Coccidiose

Sendo um agente de baixa mortalidade pela principal característica de provocar doença subclínica, pouca importância se dava ao patógeno, contudo, trabalhos recentes mediram o impacto econômico com profilaxia e prejuízos com piora da conversão alimentar (CV). Um primeiro estudo desenvolvido por Williams, (1999) no Reino Unido, com o objetivo de elaborar um sistema de custos envolvidos com a ocorrência da coccidiose, chegou-se ao valor de 38,5 milhões de libras considerando custos com medicação e com a perda produtiva. Atualmente Peek & Landman, (2011) estipularam gastos de 2 bilhões de euros no mundo, entre prejuízos com profilaxia e perdas produtivas. O impacto econômico crescente que a *Eimeria* vem demonstrando ao longo do tempo exige que seja levada em consideração o uso de medidas de controle que reduzam as perdas financeiras.

O uso das medicações é responsável por reduzir a pressão de infecção parasitária, visto que a partir do momento em que o agente está instalado é extremamente complicada a eliminação da infecção, por isso o uso das medicações via alimentação, com funcionalidade de prevenção é amplamente utilizada como estratégia sanitária. Com o advento do conceito de saúde única e surgimento de resistência à anticoccidianos, as medicações e promotores de crescimento estão sendo retirados da cadeia produtiva animal (BLAKE & TOMLEY, 2014).

2.1.5 Eimeria como agente predisponente a infecções secundárias

Rimet et al. (2019), realizaram infecção experimental com *E. tenella*, na dosagem de 4×10^2 oocistos em aves de um dia de idade, e ao 5º dia de vida inocularam baixa dosagem de *Salmonella* Typhimurium, não houve diferença significativa entre os animais inoculados com o protozoário. Enquanto trabalhos como o de Macdonald et al. (2019) utilizaram a co-infecção com *Campylobacter jejuni*, um

importante agente zoonótico transmitido por alimentos, evidenciaram que a presença do coccídio em infecções maciças contribuiu para a proliferação do *Campylobacter* no ceco das aves. As aves apresentaram lesões hemorrágicas resultantes da multiplicação das fases de esquizontes e merontes, acompanhada por evidente disbiose promovida pela intensa atividade do protozoário.

Chapman, (1997) em seu trabalho discorre a respeito do desenvolvimento de resistência à antibióticos por *Eimeria*, correlacionando o uso por um período muito extenso de um mesmo princípio ativo. Isso se dá pela redução de sensibilidade aos fármacos após exposição por longos períodos ou por linhagens de microrganismos que são geneticamente resistentes a certos fármacos, e o processo de aquisição de resistência que pode ocorrer rapidamente. Este mesmo autor, em trabalho próprio desenvolvido no ano de 1990 realizou um artigo enumerando as medicações utilizadas, a data e o primeiro caso de resistência identificado. Os resultados demonstraram que medicações como os antibióticos ionóforos, dentro de dois a três anos, apresentariam desenvolvimento de resistência como por exemplo no caso da robenidina e monensina. O caso da narasina, Weppelman et al. (1977) já demonstraram que havia resistência, enquanto o produto só seria aplicado comercialmente em 1989.

Sendo assim, a cada ano as grandes organizações mundiais voltadas à manutenção da saúde humana e animal, promovem políticas para redução do uso de antibióticos e promotores de crescimento. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e *Codex Alimentarius* ano a ano promovem eventos e criam comissões que atuam em parceria com instituições de pesquisa para o desenvolvimento de trabalhos evidenciando o desenvolvimento de resistência dos microrganismos.

Com isso, países que possuem grande potencial agropecuário, normalmente são os grandes produtores e exportadores de alimentos, se vem no papel de desenvolver normas e estratégias que promovam a redução do uso de medicações e passem a adotar medidas de controle da biossegurança da cadeia produtiva. A Instrução Normativa nº45, de 22 de novembro de 2016 (BRASIL, 2016), proíbe a produção e a importação de colistina como melhorador de desempenho, a Portaria nº171, de 13 de dezembro de 2018 (BRASIL, 2018), promulgada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), junto à Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), informa a proibição do uso de tilosina, lincomicina, virginiamicina,

bacitracina e tiamulina como promotores de crescimento. Em busca de alternativas estão sendo estudados extratos de plantas, óleos essenciais, extrato de fungos e vacinas (KIM et al. 2018).

2.1.6 Tratamentos alternativos e vacinas no controle de *Eimeria* spp

Em busca de procura por alternativas que substituam por completo alguns fármacos, se desenvolveram outras tecnologias que são promissoras a longo prazo. A vacina é a tecnologia que está em estágios mais evoluídos no seu desenvolvimento, Peek e Landman, (2011), descreveram o histórico da vacina e outras estratégias usadas para o controle. A primeira vacina comercial utilizada foi Coccivac®, em 1952 nos Estados Unidos. Atualmente o nome comercial continua a ser produzido, é composta por diferentes espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mivati*, *E. necatrix* e *E. tenella*) específicas às aves, os oocistos são vivos e são aplicados ao primeiro dia de vida sobre o alimento das aves.

O mecanismo de ação se dá pela ingestão de oocistos que foram aspergidos sobre a ração de aves de um dia de vida. Os oocistos ainda na fase não esporulada não promovem infecção, mas induzem resposta imunológica, ativada por resposta celular de memória, para que em contato futuro os prejuízos relativos a uma segunda exposição sejam menores. O uso da vacinação depende de aplicação da dosagem correta, considerando a indução da resposta imune diretamente correlacionada a quantidade de oocistos ingeridos, que se em excesso pode promover infecção no indivíduo, tornando uma estratégia que necessita de bastante controle no uso.

Aviltando a necessidade de se reduzir o risco de reversão da vacinação, se desenvolveram as vacinas atenuadas. São linhagens do protozoário submetidas a processos biotecnológicos de redução da capacidade patogênica, através de sucessivas inoculações em ovos embrionados ou pela seleção de etapas não infecciosas do ciclo evolutivo que ainda assim, promovem resposta celular porém sem os riscos de reversão. Akanbi & Taiwo, (2020), promoveram infecção em aves de cinco dias de idade com espécies locais de *Eimeria*, após vacinação com vacinas comerciais (Livacox® - Biopharm; Immucox® - Vetech), o resultado foi redução dos sinais clínicos e melhora dos índices zootécnicos dos animais quando comparadas ao grupo controle. Isso ocorre devido a seleção de fases de esquizogonia mais precoces,

que têm ínfima capacidade de infecção, mas ainda induzem formação de resposta imune.

Uma terceira possibilidade para o controle, seria a vacinação com subunidades, a seleção de compostos imunogênicos, sejam estruturas de membrana (proteínas ou lipídios), expressas no momento da infecção ou replicação, fases do ciclo evolutivo do microorganismo, como gametas, esporozoítos ou merozoítos, podem ser usados como agentes indutores de resposta imune. Há respostas positivas em aves vacinadas com antígeno de superfície 4 de *E. tenella* (EtSAG4) e um segmento gênico pEGFP-N1, foram utilizados para induzir resposta imunológica onde as aves testadas demonstraram maior peso, eliminação de oocistos reduzida e menor escore de lesão quando comparados ao grupo controle (ZHAO et al. 2019).

Atualmente estão sendo testados o uso de componentes naturais, estão sendo testados como nova possibilidade de controle da protozoose. Já são usadas algumas moléculas derivadas de produtos naturais, como: aloe vera, artemisina, betaína, carvacrol, taninos, curcumina, papaína, proantocianidina, dentre outros. As vantagens destas partículas se resumem em ser compostos naturais que tem função anti-inflamatório, antioxidante, reduz o dano citoplasmático, além de efeito imunomodulador de promover a proliferação de células imunes, aumento de citocinas e elevação dos níveis de imunoglobulinas (ABBAS et al. 2012; ADHIKARI et al. 2020).. Pop et al. (2019), testaram três combinações com diferentes compostos de várias ervas e identificaram que compostos derivados de: *Allium sativum*, *Urtica dioica*, *Inula helenium*, *Glycyrrhiza glabra*, *Rosmarinus officinalis*, *Chelidonium majus*, *Thymus serpyllum*, *Tanacetum vulgare* and *Coriandrum sativum*, foram capazes de reduzir a eliminação de oocistos, o grau de lesão do trato gastrointestinal, , obtendo melhores índices de ganho de peso e conversão alimentar.

Até o momento existem alguns fatores limitantes no uso de compostos naturais, alguns destes para que sejam utilizados precisam de quantidade elevada de matéria-prima, exigindo uma adaptação da indústria para a demanda. Embora alguns resultados se mostrem promissores, ainda há etapas a serem determinadas como a presença de resíduos no produto final e, se a longo prazo, os efeitos de resistência não se desenvolverão.

2.1.7 Ambiência e biossegurança

O ambiente produtivo é de grande importância na manutenção do status sanitário da produção avícola, para que se tenham animais saudáveis e se tornem produtos seguros. Diretrizes referentes às práticas adotadas nas etapas da cadeia produtiva, mediante execução de medidas protetivas reduzem a probabilidade da ocorrência de contaminação. Dá-se o nome de biossegurança às medidas de caráter sanitário adotadas pelas partes envolvidas no processo, que correspondem normas que regulamentam pontos a serem seguidos dentro de um sistema produtivo, baseado em dados técnicos objetivando a redução dos problemas inerentes a atividade (BERCHIERI Jr, et al. 2009).

Para tanto, os órgãos de atenção à saúde animal como o (MAPA), através dos Serviço de Defesa Sanitária Animal (SDSA), implementam programas como o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), visando a estabelecer diretrizes à atividade avícola, através da elaboração de normas que atingem produtores, empresas e técnicos ligados a atividade, mediante ao estabelecimento de medidas e parâmetros a serem adotados.

A base de um sistema de biossegurança são a organização e a limpeza geral. Ambientes organizados e limpos tornam o ambiente menos apropriado a proliferação de pragas, além do ambiente ser mais favorável aos trabalhadores. O sistema “5S”, programa de gestão de qualidade com princípios fundamentais para um ambiente favorável ao desempenho das atividades, compreendem por: senso de utilização, organização, limpeza, padronização e disciplina.

As técnicas de controle para promoção da biossegurança são adotadas em todas as etapas da cadeia produtiva, aplicando-se medidas que controlam desde os animais, o ambiente e os agentes patogênicos. Na avicultura de corte, as atividades para reduzir a ocorrência de riscos inicia-se nos incubatórios pela produção de pintos livres de contaminantes e doenças, o transporte de pintainhos até as propriedades deve ser realizado em caminhões fechados e previamente sanitizados.

As tratativas referentes à estrutura e sua devida disposição são tratadas no Programa Nacional de Sanidade Avícola, elaborado em 2006. Em conjunto a Instrução Normativa nº 56/2007 (BRASIL, 2007) trata das regras de registro e fiscalização das instalações, a propriedade deve ser cercada externamente de modo que impeça a entrada de animais estranhos. A propriedade deve ser cercada e afastada e estradas vicinais, ou rodovias, considerando que outros núcleos produtores de aves também devem estar a uma distância mínima. Em anexo, devem haver outras estruturas

pertinentes a atividade, como arco de desinfecção para veículos, vestiário para troca de vestimentas de funcionários e visitantes. Todos estes segmentos são contributivos à manutenção de status sanitário seguro.

O controle da água fornecida aos animais é importante pois é um meio de veiculação de agentes. Antes de ser ofertada aos animais “a desinfecção da água consiste na destruição seletiva dos organismos causadores de enfermidade, pela adição de desinfetante” (EMBRAPA, 2011). Ao ser armazenada em caixas d’água deverá ser tratada com cloro ativo, na concentração mínima de 3 partes por milhão (ppm) no ponto de consumo das aves e ser submetida a análises regulares de qualidade microbiológica.

O Controle de pragas com o foco de prevenir a inserção de novos microrganismos nas instalações, pode causar grandes perturbações e prejuízos aos produtores e empresas. A implantação de programa de Boas Práticas de Produção (BPP) visando promover a prática de ações para minimizar a ocorrência de patologias nos animais, motivadas por manejo inadequado, também são ferramentas fundamentais à manutenção de uma criação segura.

A cama do aviário, no qual as aves permanecem do primeiro até o último dia de vida é um assunto que necessita de muita discussão. Até o momento, poucos trabalhos foram desenvolvidos a respeito da importância da qualidade de cama ao longo de sua vida útil quando se refere à perpetuação da coccidiose dentro dos plantéis avícolas, visto que é o principal agente causador de perdas produtivas a nível mundial.

Recentemente Munir et al. (2019), produziram um artigo de revisão discutindo a respeito dos tipos de cama, suas vantagens e desvantagens. Os tipos de cama, quase em sua totalidade, vão variar conforme a disponibilidade de material e o seu custo. A matriz orgânica é a mais abundante, apresentada na forma de: madeira em lascas ou raspas de madeira, casca de arroz, palha de soja, palha de trigo, dentre outras que variam conforme a cultura produtiva da região a ser considerada. Outros materiais de matriz inorgânica como cinzas ou areia também são utilizados.

Em um estudo desenvolvido por Lrfan et al. (2017), foram testados quatro tipos de cama: palha de trigo, maravalha, polpa de espiga de milho e casca de arroz com três diferentes linhagens de aves. O resultado observado demonstrou que a diferença de conversão alimentar, ganho de peso e consumo entre os tratamentos se deu pela cama que apresentava melhores condições, ou seja, que estivesse mais seca ou que tem maior capacidade de absorção de umidade. Os autores identificaram que a casca

de arroz obteve o pior resultado enquanto a polpa de espiga de milho teve melhor desempenho. O baixo desempenho da casca de arroz foi observada pelo aumento da umidade no ambiente favorecendo a proliferação bacteriana e de mofo.

Tasistro et al. (2007), avaliaram a produção de amônia (NH_3) em palha de trigo e maravalha. Foi observado que a palha de trigo produz 19% mais amônia comparado com maravalha, especialmente quando próximo de bebedouro. Destacou-se também a influência do tamanho das partículas, se muito fina, pode formar crostas que enrijecem e dificultam a absorção de água.

DeJong et al. (2014) estudaram os efeitos de pododermatite induzida em aves sobre cama de lascas de madeira para determinar quais são as consequências de um manejo incorreto de cama. O resultado observado foi: menor ganho de peso, aumento das lesões de peito e jarretes, consequentemente, mais partes do animal são condenadas em abatedouro, e em geral redução do bem-estar dos animais

Em contraste aos resultados apresentados anteriormente para aves de corte, Regmi et al. (2019) demonstraram que em aves de postura criadas sobre palha, maravalha, grama sintética ou sob concreto, não houve diferença significativa entre as camas quando se avaliam produção e bem-estar.

O manejo da cama dos aviários pode ser determinado como ponto crucial na manutenção de status sanitário de uma granja, pois é onde as aves liberam as suas excretas e permanecem ali por lotes sucessivos. O tempo de uso é variável conforme metodologia aplicada por cada empresa ou responsável, podendo chegar até seis reusos ou seis lotes e, demanda manejo para aplicação de procedimentos com finalidade sanitária para eliminar a perpetuação de contaminantes aos lotes subsequentes.

Torok et al. (2009) avaliaram o desempenho de aves de corte criadas sobre camas de matriz de celulose ou de madeira, e dietas com baixo ou alto teor de fibra, avaliadas pela conversão alimentar e determinação das espécies de bactérias presentes no trato intestinal das aves. O resultado obtido surpreende, uma vez que a combinação de dieta com o tipo da cama pode influenciar a microbiota presente no ceco das aves, segundo os autores isso se deve pelo hábito das aves de ciscar e pelo teor de umidade que pode favorecer um ou outro grupo.

Para a redução do risco microbiológico estratégias de controle sanitário podem ser utilizadas para minimizar a chance de entrada ou perpetuação de agentes patogênicos no plantel. Roll et al. (2008) avaliaram a eficiência de um composto de

Bacillus subtilis e suas enzimas proteolítica para reduzir a matéria orgânica das camas reutilizadas que demonstraram ser efetivas reduzindo a quantidade de substrato disponível aos patógenos.

Uso de substâncias químicas ou processos físicos que alterem condições de atividade de água, pH, umidade, temperatura, desinfetantes foram aplicados na tentativa de inibir os microrganismos. Em junho de 2005, a EMBRAPA lançou um folheto sobre a reutilização da cama na criação de frangos e as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal. Este material trata resumidamente a respeito da problemática do reuso das camas, quais as implicações e métodos de controle, direcionada a agentes bacterianos (EMBRAPA, 2005).

A Instrução Normativa nº56, de dezembro de 2007, regulamenta os procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução, comerciais e de ensino ou pesquisa, preconiza que em caso de problemas sanitários, a cama deverá ser fermentada por no mínimo 10 dias antes de ser retirada ou outro método aprovado pela SDA (o reuso só será permitido para aves de corte se não houver contaminação da cama).

Bastante conhecimento a respeito dos tipos de cama e quais suas vantagens e desvantagens foram elucidados, as consequências de manejo incorreto, a interação do animal com a cama e a modificação da sua microbiota. Vê-se que a cama tem papel fundamental na produção de aves de corte e nos seus produtos, assim torna-se imprescindível que os métodos de controle e de manejo de cama sejam esclarecidos e de que maneira podem contribuir para melhor entendimento da relação hospedeiro-ambiente aplicados para a realidade da produção.

Determinado o histórico da cadeia avícola, os avanços de processo, desenvolvimento genético, nutricional, ambiência, equipamentos e nível técnico, ainda persistem algumas problemáticas de ordem sanitária, mais significantes tratando-se da retirada progressiva dos promotores de crescimento como ferramentas de controle. Assim se tornou fundamental um maior entendimento de como as estratégias sanitárias podem atuar no controle ou prevenção de doenças.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de

Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina, sob protocolo nº 38/2019.

A coccidiose sendo uma doença disseminada mundialmente no contexto da avicultura precisa de metodologias para controle e prevenção. Para isso, é preciso que se determine qual o perfil de distribuição das espécies causadoras dos sinais clínicos nas diferentes regiões, uma vez que em diferentes aviários podem haver diferentes espécies causando a doença dentro de uma mesma região, o que pode demonstrar a importância de que se estabeleçam diferentes tratamentos, como o desenvolvimento de vacinas personalizadas para atender as necessidades individuais de cada área.

3.1 LOCAL

Das propriedades selecionadas, três são do município de Palotina e uma de Maripá, na região Oeste do Paraná. As instalações dos galpões são de 150m x 12m ou 160m por 12m, para cada propriedade apenas um manejo de cama foi adotado para padronização de metodologia, estas apresentavam o mesmo perfil de construção e equipamentos (placas evaporativas, exaustores, nebulizadores de alta pressão, controladores de ambiente e cortinas laterais de polietileno preta/cinza e sistema de aquecimento operado por campânulas a gás ou forno industrial). Todas as granjas selecionadas iniciaram o primeiro alojamento com cama nova (maravalha de primeiro uso) com no máximo 15 dias de diferença entre as datas de alojamento para minimizar interferência climática.

3.2 MATERIAL DA CAMA

Para o alojamento das aves, a empresa opta por fazer uso de maravalha pela disponibilidade na região, as camas são reutilizadas por até seis lotes consecutivos. Para que possam ser reutilizadas, as camas são sujeitas à processos de sanitização no período entre lotes para torná-las mais seguras aos lotes subsequentes. A redução de umidade, amônia e controle do pH estão entre os fatores que são determinantes a perpetuação de agentes patogênicos na cama, ferramenta fundamental na manutenção da segurança microbiológica do produto final. Os processos de

tratamento de cama utilizam de manejos ou produtos que ao interagirem com o meio promovam alterações de temperatura, pH, umidade e concentração de amônia. Os três tratamentos (fermentação, calagem e a combinação de ambos) foram avaliados para determinar seus efeitos sobre o controle da coccidiose.

3.3 TRATAMENTOS AVALIADOS E PROCEDIMENTO DE COLETA

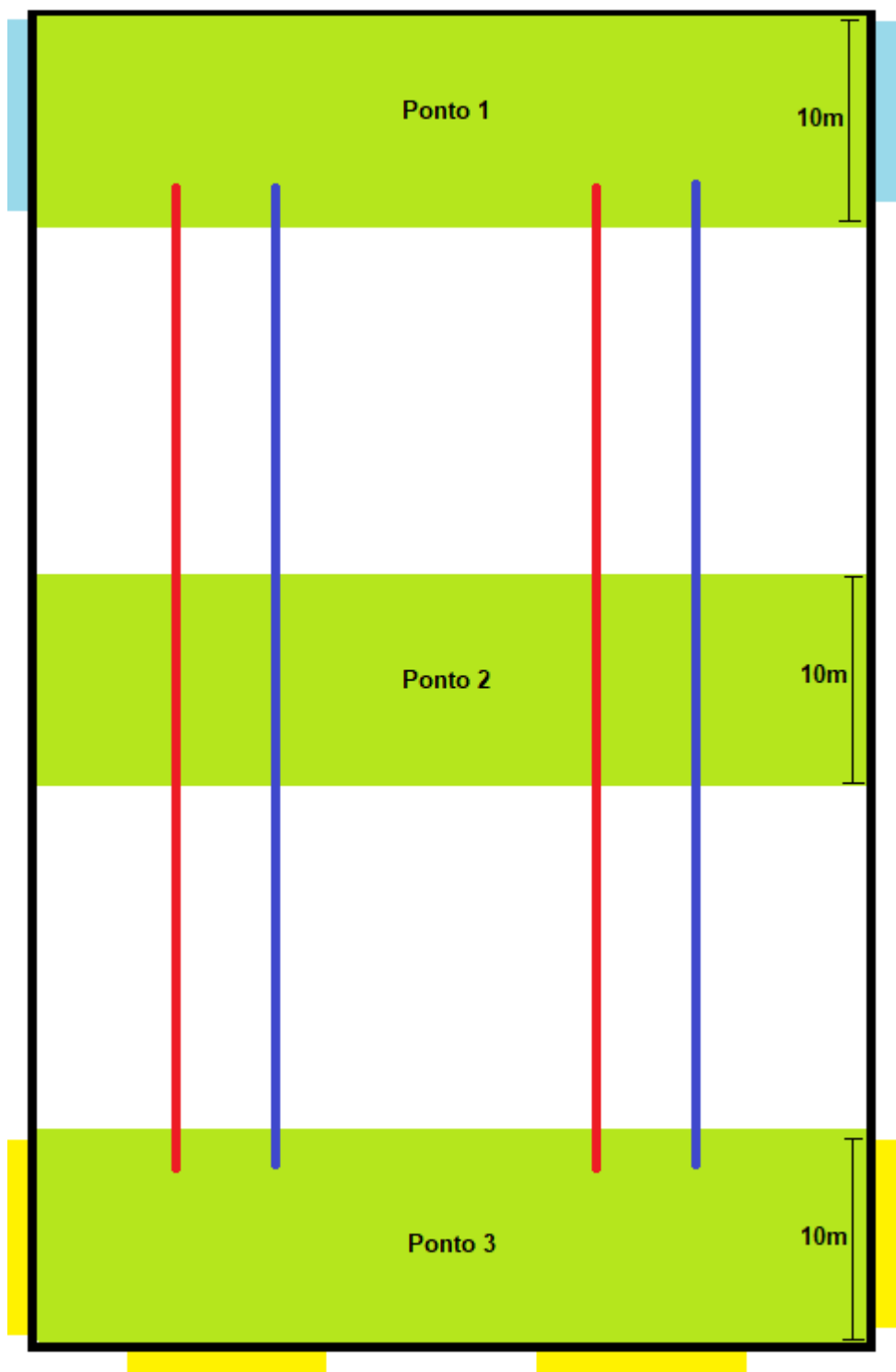
Os tratamentos impostos para a cama do aviário foram: (T1) tratamento por fermentação associada a calagem – controle; (T2) calagem; e (T3) fermentação. Para a sanitização da cama, foram aplicadas as seguintes metodologias após a desocupação de galpões: O tratamento controle teve aplicação de duas técnicas, sendo realizada primeiro a fermentação da cama, seguida da calagem. Para a fermentação da cama, esta foi amontoadada no meio do galpão até ter altura mínima de 80 centímetros seguida de compactação com auxílio de trator, e então recoberta com lona plástica para manutenção do microclima, devendo o aviário permanecer fechado por sete dias. A seguir a lona foi retirada e a cama espalhada por todo o galpão dando início a calagem que consiste na incorporação de 2kg/m^2 de sulfato de cálcio ou 800g/m^2 de óxido de cálcio com auxílio de maquinário. A cama foi revolvida três vezes ao dia até que se completassem 10 dias de sanitização. Os galpões utilizados para avaliação da calagem foram realizados apenas com a calagem e a fermentação apenas com a fermentação, seguindo respectivos processos descritos conforme o parágrafo anterior.

A coleta de amostras de excretas foi realizada em aviários comerciais de aves de corte localizados na região Oeste do Paraná. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e seis repetições, que corresponderam aos aviários. Foram considerados os efeitos fixos de tratamento, lote, pontos de coleta, idade e as interações entre tratamento e idade; tratamento e lote; lote e idade; tratamento, lote e idade; e tratamento e pontos de coleta. Cada aviário foi subdividido em três pontos de coleta (FIGURA 1), e foram avaliados, sequencialmente, seis lotes de aves por aviário, totalizando aproximadamente 1600 amostras durante o experimento.

Para coleta das amostras foram estabelecidos três pontos de coleta no sentido da entrada para o fundo do galpão, onde cada ponto apresentou entre 12 e 15m de largura e 10m de comprimento, e área aproximada de 120 m^2 , dispostos

próximo as placas evaporativas (ponto 1 - P1), no meio do aviário (ponto 2 - P2) e no final do galpão próximo aos exaustores (ponto 3 - P3) (FIGURA 1). Em cada ponto foi coletado um *pool* de no mínimo 200g de material fecal, acondicionado em saco plástico previamente identificado, para posterior análise. As coletas se iniciavam no 5º dia de vida das aves e se estendendo até o 40º, repetidas semanalmente.

FIGURA 1 - Pontos de coleta das excretas das aves nos aviários



Linhas azuis – linha de bebedouros; Linhas vermelhas – linhas de comedouros; retângulos azuis – placas evaporativas; retângulos amarelos – Exaustores; Retângulos verdes – área de coleta

As excretas foram colhidas manualmente de modo que contivessem a menor quantidade possível do material maravalha, e foram acondicionadas em recipientes coletores com a identificação do aviário e o ponto de coleta (P1, P2 ou P3) e

transportadas até o Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais (DOPA) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Todas as informações de data da coleta, ponto, aviário, idade das aves, contagem e oocistos e temperatura média (mínima e máxima do galpão) para a semana foram registradas.

3.4 MÉTODO ANALÍTICO

As amostras foram analisadas pelo método de Gordon e Whitlock modificado (1939) com auxílio da câmara McMaster para contagem de oocistos observados ao microscópio de luz em aumento de 100 vezes. O resultado foi obtido pela contagem de oocistos presentes na câmara de McMaster, multiplicando-se por 100, o fator de correção da câmara. Após encerradas as coletas e a contagem, as amostras foram submetidas à extração de material genético e reação em cadeia de polimerase (PCR) Multiplex para determinar as espécies presentes nos aviários da região.

3.5 OBTENÇÃO DE CONTROLE POSITIVO PARA AS REAÇÕES MOLECULARES

Para o controle positivo das reações moleculares, foi utilizada como amostra padrão a vacina comercial vacina comercial (Biococcivet R – Biovet®) contendo as sete espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella*, *E. praecox*, *E. mitis*) que afetam as aves para que se produzisse o controle positivo iniciou-se com recuperação de 10ml da vacina após agitação manual do frasco, que foram dispensados em um tubo tipo falcon previamente autoclavado de 50ml. Após, a vacina foi exposta a oxigenação com gás oxigênio (O²) puro de uso hospitalar seguido de acondicionamento em estufa à 30°C por 36 horas para esporulação. Em seguida submeteu-se a vacina a centrifugação à 2000g (giros) por dois minutos para sedimentação de oocistos, o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta Pasteur e os oocistos ressuspensos em 10ml de solução de NaCl 0,9% estéril para lavagem dos oocistos. A lavagem foi repetida mais uma vez com descarte de sobrenadante.

Os oocistos foram ressuspensos em quatro ml de solução de NaCl 0,9% e transferidos por inversão para dois microtubos estéreis de fundo redondo. Uma alíquota de cada microtubo foi avaliada em microscopia para determinar a presença de oocistos em magnificação de 400x. Para a extração de DNA, centrifugou-se as amostras à 3100 g x10 min para sedimentação de oocistos, o sobrenadante foi

descartado e em seguida foi adicionado 10µl de solução de hipoclorito de sódio ativo (NaClO) a 6% com auxílio de pipetador automático, seguido de homogeneização em agitador tipo vórtex durante 30 segundos. O material foi incubado a 4°C por uma hora e meia em recipiente isotérmico. A segunda etapa de choque osmótico foi feita com adição de 35 µl de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 5M com auxílio de pipetador, homogeneizado em vórtex por dois minutos, e incubando a 55°C por uma hora em banho-maria.

O controle positivo foi submetido à centrifugação a 3100g por cinco minutos e descartado o sobrenadante contendo debris dos oocistos. O precipitado foi ressuspenso em 300 µl de tampão de extração (10mM TRIS-HCl, 0,1 mM EDTA, pH=8), 3 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 10 µl de proteinase K (20mg/ml, INVITROGEN®), seguido de homogeneização em vórtex por 30 segundos e incubação a 50°C por uma hora em banho-maria, sendo estocado em congelador (-20°C) para purificação.

O processo de purificação foi realizado através do protocolo fenol-clorofórmio como descrito por SAMBROOK et al. (1989). Adicionou-se em cada microtubo com material extraído 525 µl de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 seguido de homogeneização em agitador tipo vórtex durante três minutos, e centrifugado à 14.000g por 10 minutos. Após a centrifugação recuperou-se a fase superior do microtubo e transferida a outro microtubo, e acrescido a 134µl de acetato de sódio 7M (CH₃COONa) para precipitação de sujidades, seguido de homogeneização em vórtex por dois minutos e centrifugado à 10.000g por cinco minutos. Após centrifugado a recuperou-se fase superior que foi transferida para outro tubo e acrescido a 600 µl de etanol absoluto gelado, então as amostras foram mantidas em congelador *over night*.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 30 minutos para precipitação, seguido de descarte do sobrenadante por inversão, então o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70° GL refrigerado e acondicionados em estufa a 40°C para evaporar o álcool. Para eluir o material genético, foi adicionado 50µl de tampão de extração seguido de armazenamento a -20°C.

3.6 CLARIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

A clarificação e extração foram realizadas com grupos de 24 amostras, sendo a clarificação pela metodologia descrita por Tang et al. (2018) e a extração conforme Sambrook et al. (1989). Primeiramente as amostras foram descongeladas em geladeira um dia antes da extração. Foram pesadas alíquotas de 3 gramas de cada amostra, contendo pelo menos 5×10^3 oocistos por grama de fezes, seguido de homogeneização em 10 ml solução de NaCl 0,9%. Após serem filtradas, em peneira com gaze, foram centrifugados a 3100g/10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 10µl de hipoclorito de sódio (NaClO) a 8%, seguindo de incubação a 4°C por uma hora e meia. Acrescentou-se 35µl de solução saturada de cloreto de sódio e outro ciclo de incubação à 55°C por mais uma hora. Terminada a incubação, os microtubos contendo as amostras tratadas foram centrifugados a 3100g/ 5 minutos, seguido do descarte do sobrenadante, restando apenas o *pellet* com o conteúdo desejado.

A extração foi feita com 5×10^5 oocistos por alíquota, com a adição de 300µl de tampão Tris-EDTA (TE, 10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH=8), 3µl de duodecil sulfato de sódio à 10% e 10µl de proteinase K (20mg/ml). Após uma hora de incubação em 37°C, a extração de DNA foi realizada conforme descrito em Tang et al. (2018).

A amplificação foi feita por PCR com reações de 25µl, composta por 1 µl do extrato de DNA, 0,5µl (50 pmol/µl) dos *primers* para cada espécie (TABELA 1), e 17,5 µl 2x Taq, o restante da solução completa com água livre de DNase. O processo de amplificação foi feito conforme Moraes et al. (2015). Iniciou-se a desnaturação à 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°-72°C por trinta segundos e 72°C por um minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi avaliado por eletroforese em gel de agarose à 1,5%. O desenho dos *primers* foi retirado de Fernandes et al. (2004).

TABELA 1 - Sequência dos primers utilizados na reação PCR Multiplex, tamanho dos amplicons, concentração e temperatura de anelamento

Espécie	Sequência	Tamanho (pb)	Concentração (µM)	T° Anelamento
<i>Eimeria acervulina</i>	F: 5' AGTCAGCCACACAATAATGGCAAACATG 3'	811	0,70	59,9
	R: 5' AGTCAGCCACAGCGAAAGACGTATGTG 3'			62,3
<i>Eimeria brunetti</i>	F: 5' TGGTCGCAGAACCTACAGGGGCTGT 3'	626	0,85	64,2
	R: 5' TGGTCGCAGACGTATATTAGGGGTCTG 3'			61,1
<i>Eimeria tenella</i>	F: 5' CCGCCCAAACCAGGTGTCACG 3'	539	0,55	63,5
	R: 5' CCGCCCAAACATGCAAGATGGC 3'			62
<i>Eimeria mitis</i>	F: 5' AGTCAGCCACCAGTAGAGCCAATATTT 3'	460	0,55	59,7
	R: 5' AGTCAGCCACAAACAAATTCAAACCTCTAC 3'			57,8
<i>Eimeria praecox</i>	F: 5' AGTCAGCCACCACCAAATAGAACCTTGG 3'	354	0,70	62,2
	R: 5' GCCTGCTTACTACAAACTTGCAAGCCCT 3'			62,8
<i>Eimeria maxima</i>	F: 5' GGGTAACGCCAACTGCCGGGTATG 3'	272	0,55	64,1
	R: 5' AGCAAACCGTAAAGGCCGAAGTCCTAGA 3'			62,9
<i>Eimeria necatrix</i>	F: 5' TTCATTTGCTTAACAATATTTGGCCTCA 3'	200	0,70	57,5
	R: 5' ACAACGCCTCATAACCCCAAGAAATTTTG 3'			59,8

Legenda: 5':*Forward*; 3':*Reverse*. A concentração dos *primers* e o protocolo utilizado para amplificação estão conforme descrito em Carvalho et al. (2011). A amplificação de material genético é iniciada com desnaturação inicial de 96°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por um minuto e 65°C por dois minutos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Sequência de *primers* conforme Fernandez et al. (2004).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.7.1 Dados de OOPG

Inicialmente realizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) que indicou que os dados não apresentavam distribuição normal. Assim, os dados de contagem de OPG foram submetidos à transformação logarítmica $[\log_{10}(x + 1)]$ e, posteriormente, analisados em modelo misto com medidas repetidas no tempo (que correspondeu a idade das aves; PROC MIXED). Neste modelo foram considerados os efeitos fixos de tratamento, lote, pontos de coleta, idade e as interações entre tratamento e idade; tratamento e lote; lote e idade; tratamento, lote e idade; e tratamento e ponto de coleta. O efeito aleatório de aviário aninhado dentro de produtor e tratamento também foi considerado no modelo. A estrutura de erros mais adequada para foi definida de acordo com os critérios de informação de Akaike corrigido (AICC) e Bayesiano (BICC). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (PROC LSMEANS) ao nível de 5% de significância. Os resultados serão apresentados na forma de médias e erros padrão dos dados não transformados. As análises foram realizadas no programa Statistical Analysis System, versão 9.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos avaliados e suas interações e o seu efeito estão descritos na TABELA 2 são apresentados os valores de probabilidade para o efeito de cada fator avaliado neste estudo sobre a contagem de OOPG na cama de aviário.

TABELA 2 - Efeitos avaliados na criação de aves de corte e a sua interação com a ocorrência de *Eimeria* spp, em condições de campo.

Efeitos	Valor de P
Tratamento de cama	0,0006
Lote	<0,0001
Ponto de Coleta	0,0897*
Idade	<0,0001
Tratamento de cama x Idade	<0,0001
Tratamento de cama x Lote	<0,0001
Lote x Idade	<0,0001
Tratamento de cama x Ponto de coleta	0,5143
Tratamento x Lote x Idade	<0,0001

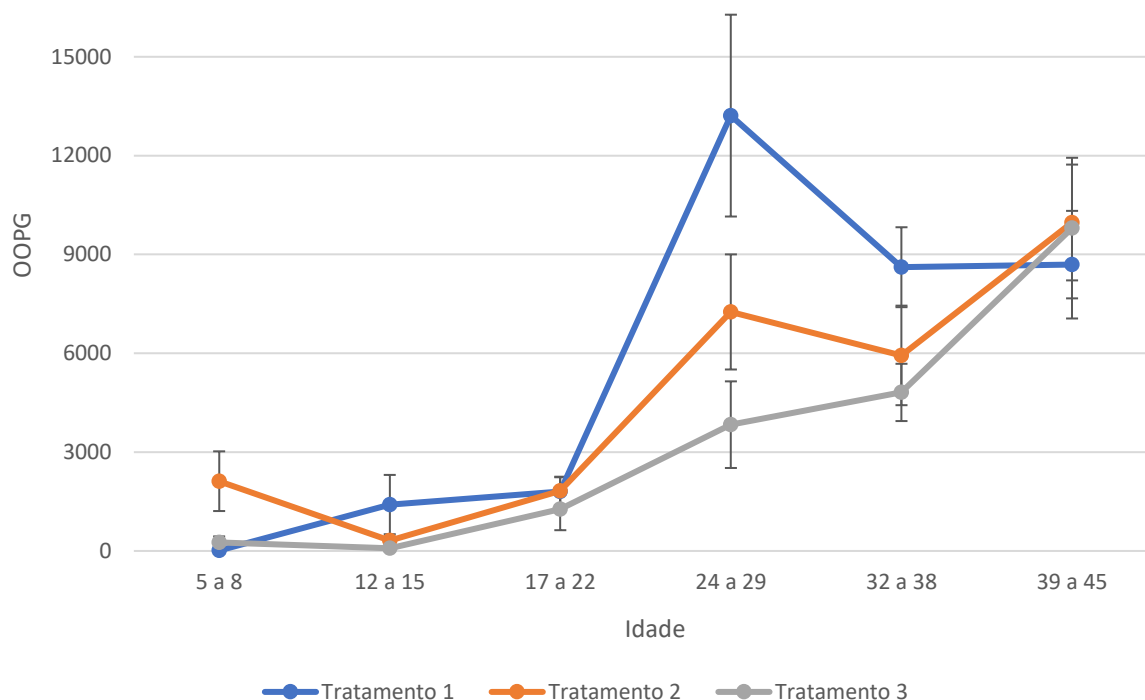
Valor de significância para $p \leq 0,05$;

*Efeito com valor ($p \in x$, $0,05 < x < 0,1$) foram considerados como tendência.

Ao avaliar a interação entre tratamento da cama e a idade das aves (TABELA 3), observou-se que a eliminação de oocistos se inicia no final do período pré-patente (FIGURA 2) conforme também evidenciado por Zulpo et al. (2007), ao avaliarem o comportamento da eliminação de oocistos em aves infectadas artificialmente. O uso do OOPG como valor de referência para controlar a infecção pelo coccídeo baseia-se, principalmente, no comportamento reprodutivo da *Eimeria* spp. onde a produção de oocistos é o parâmetro que demonstra ser diretamente proporcional à capacidade do patógeno em lesionar o trato gastrointestinal (CHASSER et al. 2020). Lillehoj e Ruff, (1987), evidenciaram a importância da dose de infecção de oocistos para provocar lesão nas aves, sendo que a capacidade reprodutiva e a eliminação de oocistos estão diretamente relacionados aos tratamentos impostos que estão sendo testados, onde o maior valor de OOPG se deve a maior ingestão de oocistos viáveis, sendo o contrário também verdadeiro.

Houve baixa quantidade de oocistos eliminados pelas aves aos 5 dias de idade nas camas tratadas com T1, ou apenas por T3 (<100 e 250 OOPG, respectivamente), o que destaca a importância do ambiente na primo-infecção das aves. vale ressaltar que a primeira cama é nova e não foi submetida a nenhum dos tratamentos avaliados neste trabalho. Posteriormente houve queda de OOPG, e um segundo pico expresso entre 24 e 38 dias, decorrente da reinfecção das aves, com estabilização para os três tratamentos, sem diferença significativa.

FIGURA 2 - Comportamento da excreção de oocisto de *Eimeria* spp. por frangos de corte, alojados sobre camas submetidas a diferentes métodos de tratamento em aviários comerciais na região Oeste do Paraná.



Michael (2005) ressaltou que o período compreendido do 5º ao 12º dia, podendo se estender até o 20º dia, corresponde à repicagem, momento de reinfecção das aves no qual estas ingerem oocistos esporulados presentes na cama pela segunda vez. No presente estudo, este comportamento foi observado pelo aumento progressivo do OOPG. O período de repicagem varia pois depende das espécies, quantidade e viabilidade dos oocistos. Williams (2001) contaminou indivíduos de *Gallus gallus* com oocistos das sete espécies de *Eimeria* das aves, e identificou que o período de pré-patência variava de 5 a 17 dias, sendo diretamente dependente quantidade de oocistos, onde doses mais baixas tem período pré-patente menor do que doses muito maiores. O comportamento avaliado demonstra que o segundo pico de OOPG ocorreu entre o 24º e 29º dias em todos os tratamentos (FIGURA 2), o comportamento foi semelhante ao que foi discutido por Chapman et al. (2016) em estudo realizado com camas de aviário de corte comercial, demonstraram que o pico pode ocorrer entre o 20º e 33º dias.

Após o 30º dia, há redução dos níveis de OOPG tendendo a estabilização entre 8×10^3 e 1×10^4 oocistos. Geralmente este efeito está associado a imunidade adquirida pelas aves, reduzindo consequentemente a atividade do parasito e a eliminação de

oocistos (MICHAEL, 2005; KAWAZOE et al. 2009; CHAPMAN et al. 2016). Este efeito foi observado em todos os lotes, com mais intensidade nos aviários submetidos ao tratamento com associação de fermentação e calagem. Enquanto o tratamento 1 demonstra queda dos valores de OOPG a partir do segundo pico e se estabiliza até o 45º dia, a calagem e a fermentação não demonstraram pico de OOPG tão expressivo quanto o tratamento 1, o que pode estar relacionado com a menor quantidade de oocistos ingeridos que não se desenvolveram suficientemente para promover formação de pico, evidenciando menor impacto da coccidiose em aves que estão em camas tratadas com apenas um tratamento (fermentação ou calagem).

O processo de fermentação promove aumento da temperatura da cama podendo atingir entre 50 e 70°C. É a principal ferramenta no controle de agentes patogênicos, além da redução de umidade e controle de amônia (PACE et al. 1995). Os resultados mensurados nesta pesquisa demonstraram que o uso da fermentação obteve a melhor capacidade no controle da reprodução de oocistos (3833 OOPG) quando se avalia o período entre o 24º e 29º dias, quando comparado com controle e a calagem, com 13216 e 7256 oocistos respectivamente, onde ocorre o segundo pico de eliminação de oocistos (TABELA 3). Para a *Eimeria* spp. exposição à altas temperaturas são deletérias devido a sua baixa resistência ambiental, assim como redução da saturação de oxigênio e a diminuição de umidade abaixo de 25%, não são favoráveis a esporulação de oocistos reduzindo a capacidade infectante. A calagem obteve resultado próximo a fermentação quando se considera o pico entre o 24º e 29º dias (7256 e 3833, respectivamente). O tratamento 1 demonstrou o pior resultado com elevação para 13216 OOPG.

O menor desempenho do tratamento 1 na redução da eliminação de oocistos na cama pode estar ligada a redução da eficiência dos tratamentos quando combinados. Os métodos quando usados individualmente foram eficientes no controle de *Salmonella* e *Clostridium* através de ação na umidade, pH e, quando se considera a fermentação também ocorre controle de temperatura. É importante destacar que o processo fermentativo acidifica o pH da cama (entre 6 e 7) pela atividade bacteriana, enquanto a calagem alcaliniza e reduz a produção de metano, consequente a redução da atividade bacteriana (KELLEHER et al. 2002; SILVA et al. 2007). O efeito residual do tratamento fermentativo pode ser afetado pela adição de cal, a elevação de pH ácido para um pH entre neutro e básico não tem ação sanitizante para os principais grupos de microrganismos que são patogênicos às aves.

Garcés-Gudiño, (2018) realizaram avaliação da diferença de qualidade sanitária entre cama de primeiro, segundo e terceiro reuso para aves de corte, e identificaram maior contagem de oocistos na de primeiro uso. A hipótese do trabalho foi de que o acúmulo de matéria orgânica dilui os oocistos, logo menos oocistos são ingeridos pelas aves. Nesta pesquisa na avaliação dos cinco lotes constatou-se que a redução da contagem de oocistos tem interação com outros fatores, uma vez mesmo com maior quantidade de lotes houve redução de oocistos independente do tratamento utilizado. É imprescindível ressaltar que no quarto e quinto lotes a cama estava composta em sua maior parte de matéria orgânica, uma vez que não há reposição com maravalha nova, e ainda sim os picos de eliminação foram diagnosticados embora com o valor médio reduzido progressivamente.

Chapman et al. (2016) assim como Garcés-Gudiño, (2018) identificaram que mesmo em galpões higienizados antes do início dos trabalhos foi verificada presença de oocistos logo nas primeiras avaliações da cama, demonstrando a dificuldade do controle de *Eimeria* na criação à campo. Essa dificuldade foi associada com os métodos preconizados para a higienização e com a contaminação carregada por fômites, como equipamentos ou ainda os calçados dos colaboradores. Em nosso experimento, as coletas realizadas ainda no primeiro lote, em todos os tratamentos, só demonstraram contagem de oocistos a partir do 17º dia, e nos lotes subsequentes já se encontravam oocistos no 5º dia sem reposição de cama, ressaltando a dificuldade no controle.

A calagem e a fermentação (tratamentos 2 e 3), quando usados isoladamente como proposta para o controle da coccidiose, foram os métodos mais eficientes na redução dos valores obtidos de OOPG (FIGURA 2). O período entre o 10º e o 20º dia de vida das aves, compreende a replicação dos oocistos no seu ciclo de vida, apresentando maior número médio de oocistos excretados, isto possibilita a avaliação mais apurada do efeito, do 22º dia em diante nos tratamentos 2 e 3. A fermentação da cama (fermentação) em números absolutos é mais eficiente do que a calagem, apresentando OOPG com 3833 e 7256 oocistos, respectivamente (TABELA 3). Após o 39º dia os resultados são semelhantes, o que pode ser explicado pela atividade imunológica das aves, que tem o principal efeito de controle na eliminação de oocistos.

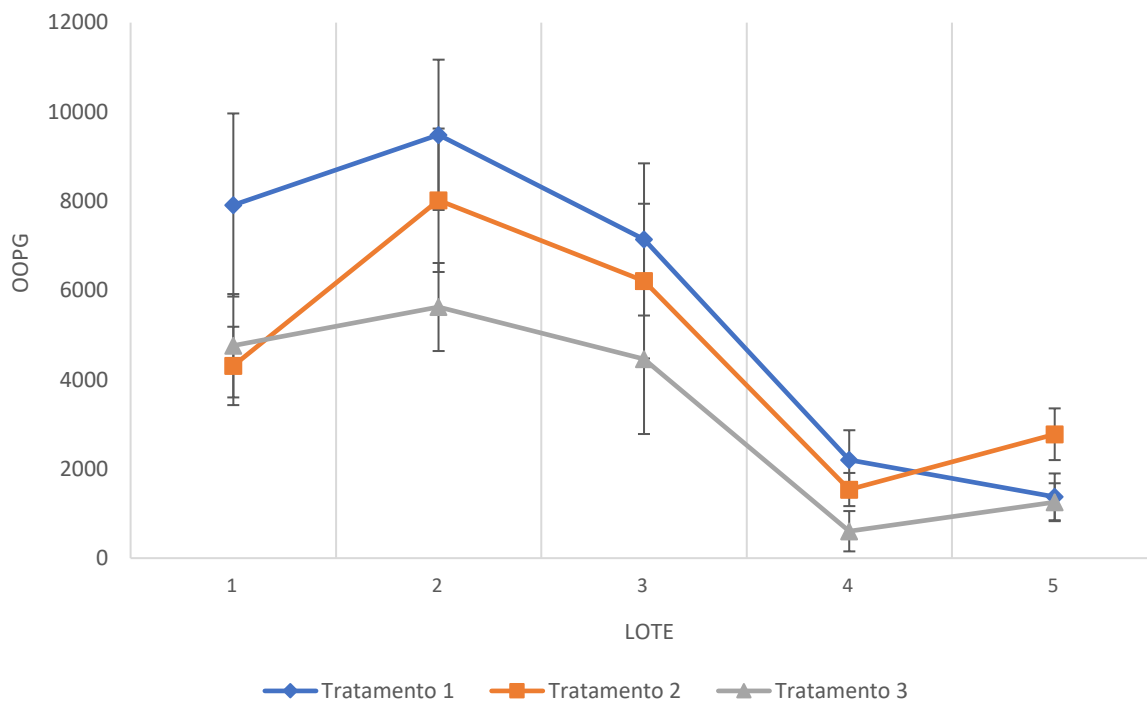
TABELA 3 - Valor médio de OOPG em fezes de aves coletadas de aviários comerciais em relação aos diferentes tratamentos usados nas camas.

Tratamentos	Idade (dias)					
	5° a 8°	12° a 15°	17° a 22°	24° a 29°	32° a 38°	39° a 45°
1	13 ^{Ad}	1408 ^{Ac}	1801 ^{Ab}	13216 ^{Aa}	8613 ^{Aa}	8690 ^{Aa}
2	2118 ^{Ab}	316 ^{Ab}	1824 ^{Ab}	7256 ^{ABa}	5936 ^{Aba}	9971 ^{Aa}
3	254 ^{Ac}	81 ^{Ac}	1269 ^{Ac}	3833 ^{Bb}	4812 ^{Bb}	9801 ^{Aa}

*Letras maiúscula comparam as idades respectivas e as letras minúsculas comparam os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como pode ser observado na FIGURA 3, a contaminação da cama ocorre no final do lote, a partir da idade de 39 dias, principalmente nos tratamentos individuais com calagem ou fermentação, condição esta que justifica o número elevado de OOPG logo nos primeiros lotes alojados, como pode ser demonstrado na FIGURA 3 e assim proporcionar maior contaminação nos lotes subsequentes. Ao se analisar a interação entre os diferentes tratamentos e o número de lotes alojados, pode-se observar a redução gradual na contagem de oocistos com o uso da cama (FIGURA 3).

FIGURA 3 - Comportamento da excreção de oocisto de *Eimeria* spp. por frangos de corte, alojados sobre camas submetidas a diferentes métodos de tratamento em aviários comerciais na região Oeste do Paraná.



A interação proposta entre o número de lotes alojados e os tratamentos para a cama, apresentaram diferença significativa (FIGURA 3). Observou-se o mesmo comportamento ao longo de todo o período, com o pico de OOPG no segundo lote, seguido de declínio nos lotes subsequentes. Assim, foi possível verificar que os lotes alojados com o tratamento 3 (fermentação) apresentaram um menor valor de oocistos durante todo o período. A contaminação inicial é existente em todos os galpões, como já foi descrito por trabalhos discutidos anteriormente, e a queda progressiva do número de oocistos (COSTA et al. 2000; CHAPMAN et al. 2016).

O primeiro e segundo lotes apresentaram maior nível de contaminação do que os lotes subsequentes. As hipóteses podem explicar este tipo de comportamento podem estar ligadas a características particulares do material da cama, por vezes, a maravalha ainda nova pode conter maior quantidade de umidade, o que favorece a perpetuação da *Eimeria*. A interação entre o ambiente produtivo e as condições de temperatura e umidade também tem de ser consideradas, a exposição do chão batido sobre o qual as camas são depositadas podem conter oocistos que ali permaneceram

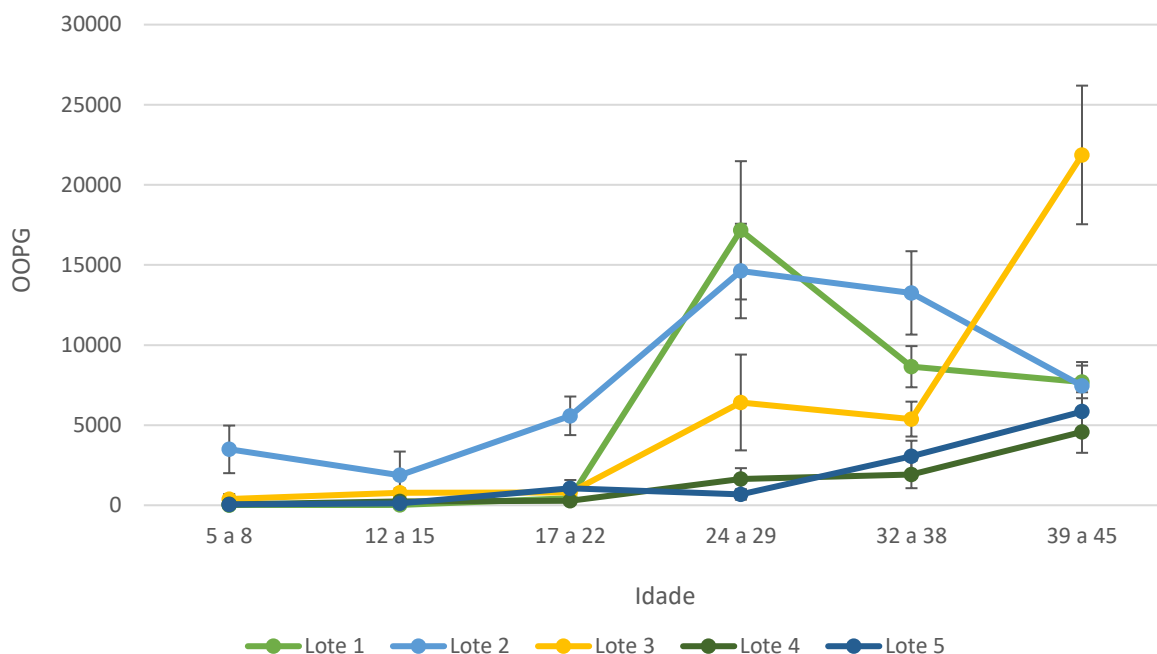
da cama anterior. Ao se colocar a cama nova estes podem ser incorporados e serem fonte de novas infecções.

O fator climático também é importante, o primeiro e segundo lotes ocorreram em período de final de primavera, outono e início de inverno, embora a temperatura ambiental seja menor, a aglomeração das aves e uso de sistema de aquecimento eleva a temperatura de dentro dos galpões, porém pouco uso é feito da ventilação forçada, logo a menor renovação de ar dificulta o controle de umidade, assim, de maneira indireta acaba-se por criar um ambiente ideal a proliferação do protozoário. Outros trabalhos que testaram a interação da cama com a *Eimeria*, como de Assis (2009), Chapman et al. (2016) e Garcés-Gudiño et al. (2018), discutem a respeito da contaminação do primeiro lote ser significativamente superior aos lotes subsequentes, as hipóteses dos trabalhos se direcionam a maior quantidade de matéria orgânica com a maravalha da cama, porém em nenhum destes foi feita avaliação objetiva de métodos de controle para as contaminações, o que difere deste experimento onde foram testados três tratamentos para o controle da cama, sendo que foram observados os lotes durante 320 dias de uso da cama. Costa et al. (2000) ao avaliarem diferentes protocolos para o uso de moléculas coccidiostáticas e coccidiocidas aplicadas em aves de corte, relataram que a contaminação da cama aumentou do primeiro até o quarto reuso, porém o trabalho foi realizado em gaiolas.

O comportamento observado na produção de oocistos reitera que os lotes iniciais são mais propensos a causar maior contaminação das aves do que lotes de camas mais reutilizadas (FIGURA 3), principalmente até o terceiro lote.

Aves mais jovens possuem menor número de eliminação de oocistos, respeitando o ciclo natural do protozoário. É interessante ressaltar, que embora haja variação do número de OOPG entre os tratamentos de acordo com a idade, do primeiro até o terceiro lote, até o 22º dia de idade. Os valores de OOPG médio são menos expressivos, ressaltando que em animais mais jovens o número de oocistos ingeridos na primo-infecção ainda é baixo. A partir do 23º dia as diferenças de eliminação de oocistos entre os lotes são evidentes, provavelmente está ligada a diferença entre os tratamentos que tem influência sobre a quantidade de oocistos eliminada na cama e a imunocompetência dos animais (FIGURA 4).

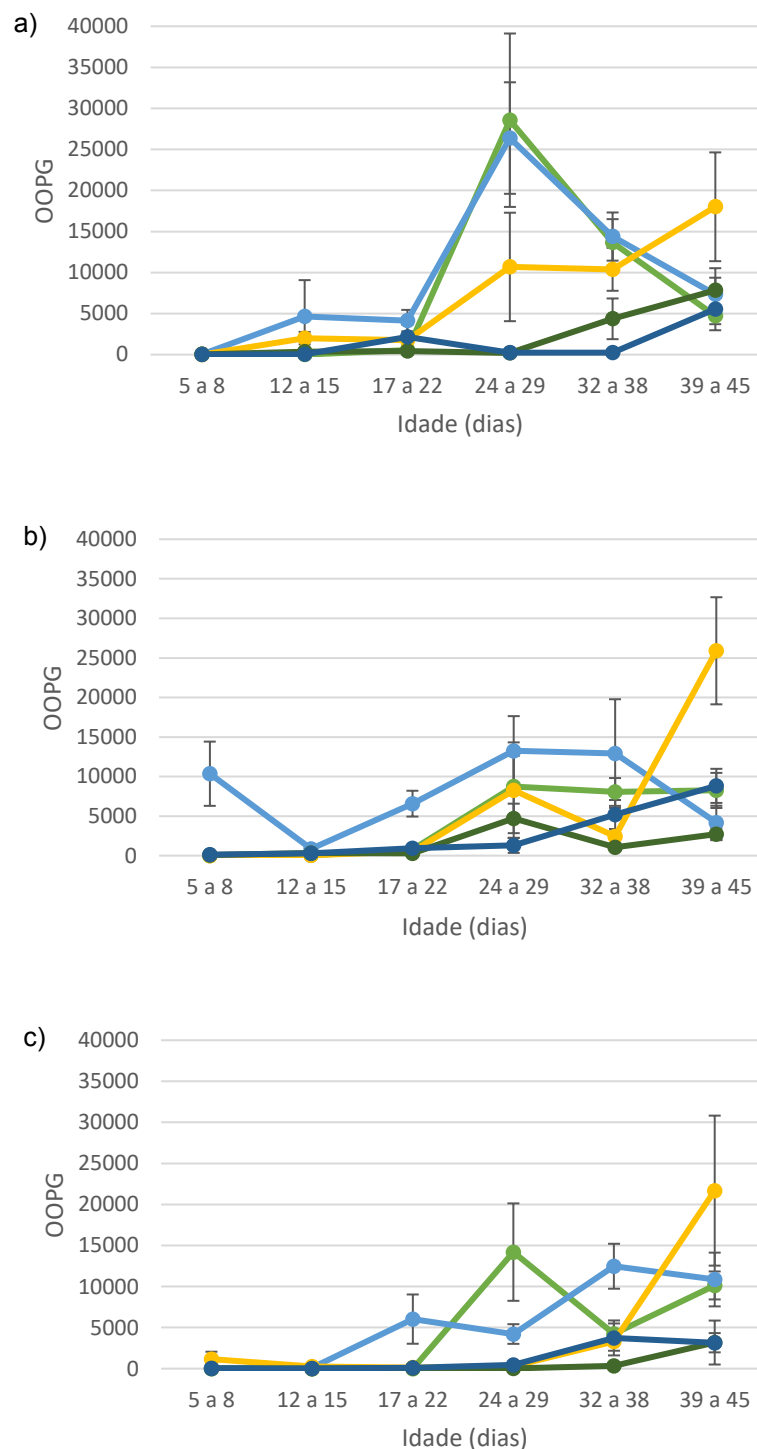
FIGURA 4 - Atividade de eliminação de oocistos de *Eimeria* spp. em diferentes tratamentos da cama de acordo com a idade das aves por lotes subsequentes.



Torna-se indispensável o manejo sanitário da cama, respaldado no comportamento de queda constante e progressiva em valores numéricos do OOPG. Para o quarto e quinto lote, há diferença quando comparado com os lotes anteriores, desta maneira reitera-se a necessidade de se escolher o tratamento adequado, pois mesmo em lotes que contenham grandes quantidades de matéria orgânica o manejo para tratamento de cama ainda é eficiente para controle de coccidiose.

A queda dos valores médios de OOPG com a progressão do uso da cama em lotes subsequentes pôde ser associada aos tratamentos ($p=0,0006$), observado principalmente no período entre o 24° e 38° dias pela queda progressiva de OOPG (FIGURA 4). Conforme Lillehoj e Ruff, (1987) e Chasser et al. (2020), a redução de OOPG reflete a ação dos tratamentos avaliados (FIGURA 5).

FIGURA 5 - Representação do desempenho dos lotes de acordo com a idade para cada tratamento proposto; Tratamento 1 (a), tratamento 2 (b) e tratamento 3 (c).



Legenda: Verde claro (Lote 1); Azul claro (Lote 2); Amarelo (Lote 3); Verde escuro (Lote 4); Azul escuro (Lote 5).

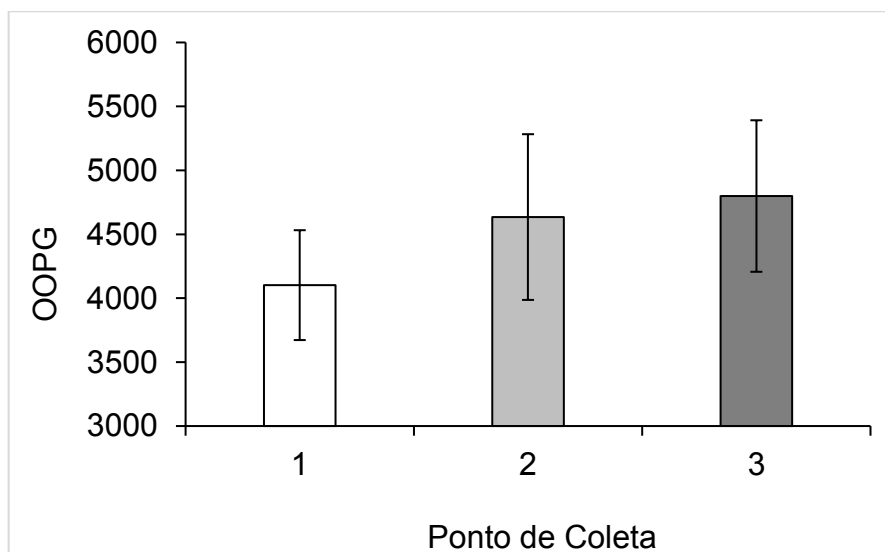
Para os lotes em que se utilizou o tratamento 1 notou-se que o protozoário desenvolveu seu comportamento natural com a infecção inicial das aves, um pico de produção de oocistos ainda precoce e menos significativo, e entre o 25º e 35º dias

houve o segundo pico de produção de oocistos. E este comportamento pode ser observado com mais efeito no primeiro e segundo lotes, seguido de queda na eliminação de oocistos nos lotes seguintes neste intervalo de idade (FIGURA 5a). Já para os tratamentos individualizados (FIGURA 5b e 5c), os picos de eliminação de oocistos são bem menores, observado principalmente nos dois primeiros lotes avaliados, quando comparados ao tratamento controle. Quando se avalia o comportamento de eliminação de oocistos, os picos são menos significantes quando tratadas apenas com o tratamento 2 ou 3, o que pode inferir na menor ingestão de oocistos viáveis, permitindo que se entenda que a infecção foi menos significativa, ambos tratamentos individualizados apresentaram capacidade de reduzir a contaminação da cama. Também é fundamental destacar que a partir do 40º dia em diante, a contagem de oocistos tende a aumentar para os três tratamentos, mas como nesta idade as aves estão próximas ao abate, qualquer aumento na eliminação de oocistos traria pouco impacto econômico e sanitário. Os tratamentos 2 e 3 retardam o pico de eliminação de oocistos esperado entre os 25 e 35 dias, o que permite dizer que tratar a cama somente com tratamento 2 ou tratamento 3 torna-se mais eficiente, considerando o tempo de permanência das aves até a idade de abate.

Os aviários são construídos com objetivo de possibilitar a criação de um microclima, sanidade e bem-estar favoráveis à criação animal. O controle de iluminação artificial, cama, ventilação, temperatura e barreiras sanitárias são fatores controlados dentro da produção avícola. Cerca de 80% da energia metabólica das aves é utilizada para a manutenção térmica, enquanto apenas 20% é destinada à produção (EMBRAPA, 2011). O sistema é desenvolvido para que ocorra maior homogeneidade dentro do aviário, porém com a progressão da criação nota-se que há diferença visual dentro do galpão.

A análise dos pontos de coleta no aviário foi realizada a partir de *pool* de amostra para cada ponto, como já demonstrado pela FIGURA 1. As variações de OOPG por ponto de coleta apresentaram pequena variação, o que não necessariamente indica que população de oocistos se distribua conforme as condições do aviário (FIGURA 6). Apesar do número de oocistos detectados em cada ponto de coleta serem semelhantes em valores de OOPG, o ponto de coleta P1 apresentou tendência a ser significativo ($p=0,0897$).

FIGURA 6 - Contagem de OOPG médio para os pontos de coleta estabelecidos



Durante todo o período de coletas, o ponto 1 (entrada do aviário, próximo às placas evaporativas), apresentou-se, visualmente, em melhores condições do que os pontos 2 (meio do aviário) e 3 (região próxima dos exaustores), com a cama mais homogênea, espessa e seca. Ponto importante também é a formação de cascão na cama por acúmulo de matéria orgânica e umidade, menos frequente no ponto 1 do que em 2 e 3. O acúmulo de sujidades nas estruturas, como linha de comedouros é notadamente menor no ponto 1 do que nos pontos 2 e 3, provavelmente por estar próximo a fonte de ar limpa, sendo que a corrente de ar no aviário conduz a poeira suspensa para o fim das instalações. A movimentação das aves suspende partículas de poeira, matéria orgânica e penas na cama, sendo levadas pela pressão negativa para os pontos 2 e 3. No ponto três, o acúmulo de sujeira nas estruturas é visualmente maior, a cama tem mais partículas finas e penas quando comparado ao 1. Raramente foram observados vazamentos pelos *nipples* da linha de água, e quando ocorriam, eram ao final da linha de bebedouros, próximo ao 3, causando acúmulo de umidade, condição que favorece a perpetuação de microrganismos.

A confirmação para as espécies de *Eimeria* spp. que estão presentes na criação de aves de corte pode ser bastante importante para se determinar as estratégias de controle. A imunidade produzida contra a *Eimeria* é espécie-específica, ou seja, dentre as sete espécies que afetam as aves de corte, pode-se dizer que os indivíduos são imunocompetentes apenas às espécies que já desenvolveram resposta. Atualmente, os protocolos vacinais usados no controle da coccidiose são

compostos de vacinas inativadas de múltiplas espécies, algumas contêm todas as sete, situação que pode funcionar bem para alguns casos, porém trabalhos como de Moraes et al. (2015), onde foi pesquisada a prevalência de *Eimeria* spp. de 250 propriedades no estado de Santa Catarina, demonstra que as *Eimerias maxima* (63,7%), *acervulina* (63,3%) e *tenella* (54,6%) são as mais prevalentes, enquanto as outras ocorrem com menor frequência. O uso de vacinas, contendo todas as espécies patogênicas de *Eimeria* spp. pode aumentar o risco de reversão provocando a doença, introduzir novas espécies no plantel em caso de falhas na administração, além dos animais dispenderem maior gasto energético para formação de resposta imunológica contra um agente que não fazia parte deste microambiente.

Novas estratégias de preparo das vacinas precisam ser estudadas para que a composição de espécies seja mais próxima para a realidade do plantel em que será utilizada, e dentre as metodologias para identificar quais as espécies que estão presentes e proporcionar melhor resposta, surgem como possibilidade o uso de ferramenta de biologia molecular como a PCR.

O uso de métodos de diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade como a PCR é ferramenta que pode ser muito útil no auxílio desta tarefa. Dentre elas a PCR Multiplex, é uma metodologia que possibilita em apenas uma reação realizar o diagnóstico de mais de uma espécie ao mesmo tempo e assim reduzir o custo e o tempo para o diagnóstico permitindo que um maior número de planteis seja testado como proposto por You (2014) e Moraes et al. (2015).

Para o preparo das amostras, a metodologia padrão para purificação de amostras foi adaptada a proposta por Tang et al. (2018), com uso de hipoclorito de sódio e choque osmótico com solução saturada de cloreto de sódio. Esses autores tiveram sucesso com a extração de amostras purificadas e não-purificadas partindo de amostras com até 2×10^2 oocistos. Em nosso trabalho utilizamos para identificação das espécies de *Eimeria* spp. as amostras que apresentaram a contagem superior a 5×10^3 oocistos por grama de fezes. Este valor foi estabelecido com objetivo de aumentar a chance de recuperação de material genético, considerando que para cada extração foram utilizadas três gramas de amostra, ou seja, o valor mínimo de oocistos foi de $1,5 \times 10^4$ (FIGURA 7).

FIGURA 7- Amostra de campo após centrifugação para extração do DNA (a) e oocistos esporulados obtidos a partir da purificação da vacina comercial Biococcivet R (Biovet®) (b).

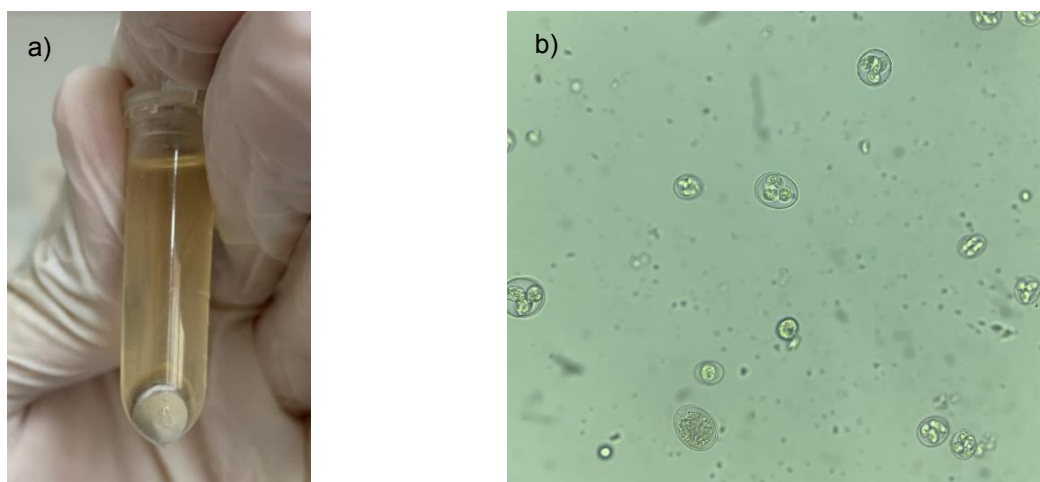
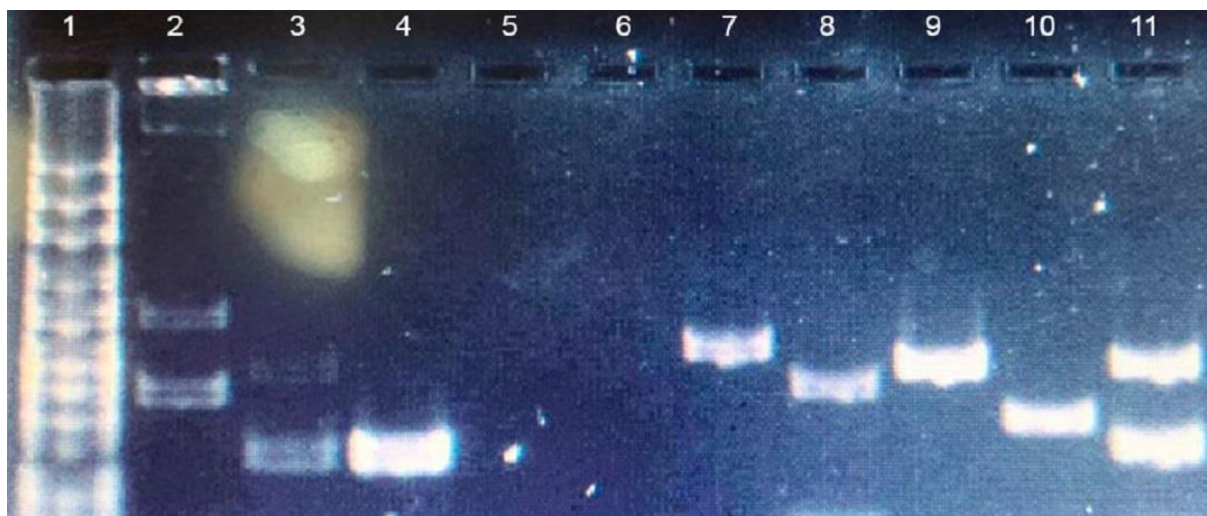


FIGURA (b) - Magnificação em 400x.

A reação de PCR foi realizada a partir dos volumes de 17µl de Go Taq Green Master Mix (2x) (400µM de nucleotídeos adenina, guanina, citosina e timina, e 3mM de MgCl₂ em pH=8,5 - Promega®), 1µl de cada *primer* F e R, 2 µl de amostra e 8 µl de água livre de DNase. Em paralelo as reações foram realizadas com os *primers* para cada espécie individualmente em volume de 35µl. A eletroforese foi feita em gel de agarose à 1,6% em 100V por 40 minutos e submetido a fixação em solução de brometo de etídio (EtBr) por 30 minutos.

Como o resultado do primeiro teste da reação de PCR não foi satisfatório, pela baixa intensidade de marcação das bandas no gel, optou-se por aumentar a concentração de agarose do gel para 2,5% e ajustar o volume da reação para 25µl, sendo: 12,5µl Taq DNApolimerase, 1 µl de cada primer F e R, 2 µl de amostra e 8,5 µl de água free DNase. Todas as reações individuais apresentaram amplificação, exceto para *E. necatrix*. O mix 1 (contendo quatro primers) apresentou banda para *E. acervulina* (811pb) e *E. maxima* (460pb), enquanto o mix 2 (com três primers) identificou *Eimeria tenella* (539 pb) e *E. maxima* (272 pb). A combinação correta dos primers usados na composição dos mixes é essencial para que não ocorra interferência entre um primer e outro, por formação de dímeros, *hairpins* ou produtos inespecíficos, que podem ser evitados quando se combinam primers com temperatura de anelamento próximas (BARBOSA, 2010).

FIGURA 8 - Eletroforese em gel de agarose a 2,5% das reações individuais e de PCR-Multiplex, para o controle positivo, proposto para a determinação das espécies de *Eimeria* spp.

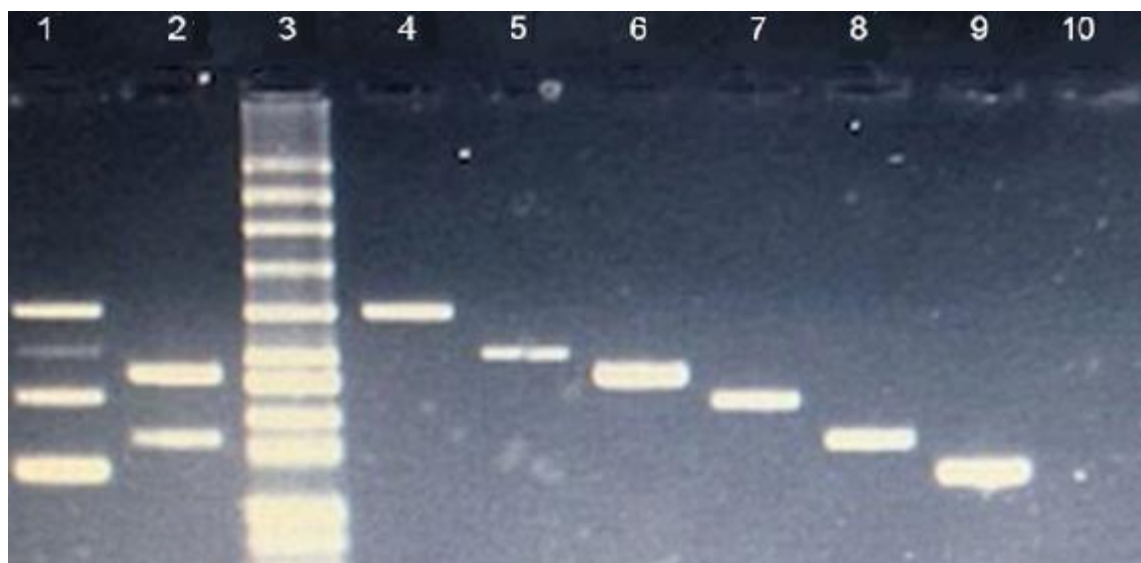


Legenda: Line 1 – Marcador de peso molecular; Line 2- (*E.acervulina* - 811 pb; *E. mitis* 460 pb); Line 3 - (*E. tenella* – 539 pb; *E praecox* – 354 pb); Line 4 - *E. maxima* – 272 pb; Line 7 – *E. brunetti* – 626 pb; ; Line 8 – *E. tenella* – 539 pb; Line 9 – *E. mitis* – 460 pb, Line 10 – *E. praecox* – 345 pb e Line 11 – Duplex (*E. maxima* e *E. tenella*).

Na FIGURA 8 pode ser observado a ausência de duas bandas para a reação da line 1 e uma banda para a line 2, e desta forma, necessário que se fizesse um rearranjo da combinação. Na line 10, realizou-se reação duplex, com primers de *E. maxima* e *E. tenella*, observou-se que a intensidade de banda da reação duplex se assemelha as reações individuais, enquanto as reações Multiplex demonstraram bandas mais fracas.

Após a realização de vários testes, os volumes das reações foram reajustados e os *primers* recombinaos, conforme esquema proposto por Carvalho et al. (2011), com: mix 1 (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis* e *E.maxima*) e, mix 2 (*E. tenella*, *E. necatrix* e *E. praecox*). Os volumes da reação foram reajustados para 17,5µl de Taq polimerase; 0,5 µl de cada *primer* F e R, 1µl de amostra para volume total de 25µl por reação. Para confirmação da especificidade dos *primers*, foi realizada a reação individual com cada espécie (FIGURA 9).

FIGURA 9 - Padronização do teste de PCR Multiplex para detecção de *Eimeria* spp com DNA vacinal.



Legenda: Eletroforese em reação de agarose à 2,5% em reação de 25µl, com 0,5µl de *primer*, 1µl de amostra e alteração da configuração de *primers*. Line 1 - Mix 1 - (*E. acervulina* – 811 pb, *brunetti* – 626 pb, *mitis* – 460 pb e *maxima* – 272 pb); Line 2 Mix 2 - (*E. tenella* – 539 pb, *praecox* – 354 pb); Line 3 - Marcador de peso molecular; Line 4 *E. acervulina* – 811 pb; Line 5 – , *brunetti* – 626 pb; *E. tenella* – 539 pb; Line 7 – *mitis* – 460 pb; Line 8 – *praecox* – 354 pb; Line 9 – *E. maxima* – 272 pb.

Obtido o melhor resultado para a combinação dos *primers*, esse protocolo foi determinado para a identificação das amostras de campo. Contudo, ainda não foi possível identificar banda para *E. necatrix*, nem para a reação individual (linha 10) nem para a reação Multiplex (linha 2). Verificando-se o trabalho de Carvalho et al. (2011), usado como referência, a sequência de oligonucleotídeos utilizados na configuração de *primers* e a vacina utilizada para confecção do controle positivo, foram exatamente os mesmos. Os relatórios de qualidade foram checados, junto ao fornecedor dos *primers* e não foram identificadas nenhuma divergência. Desta forma, acredita-se que a cepa de *E. necatrix*, usada na vacina, pode não ser compatível com a sequência de nucleotídeos, promovendo heterogeneidade e impossibilitando o anelamento ou a incompatibilidade com o tamanho da região amplificada, que geralmente ocorre na sequência e 3' da região ITS-1. Lew et al. (2003), identificaram um isolado desta espécie na Austrália, que possuía 20 pb a menos do segmento 3' do que os outros encontrados, e assim comprovou as dificuldades para diagnóstico o que pode ser um dos fatores que influenciaram neste trabalho.

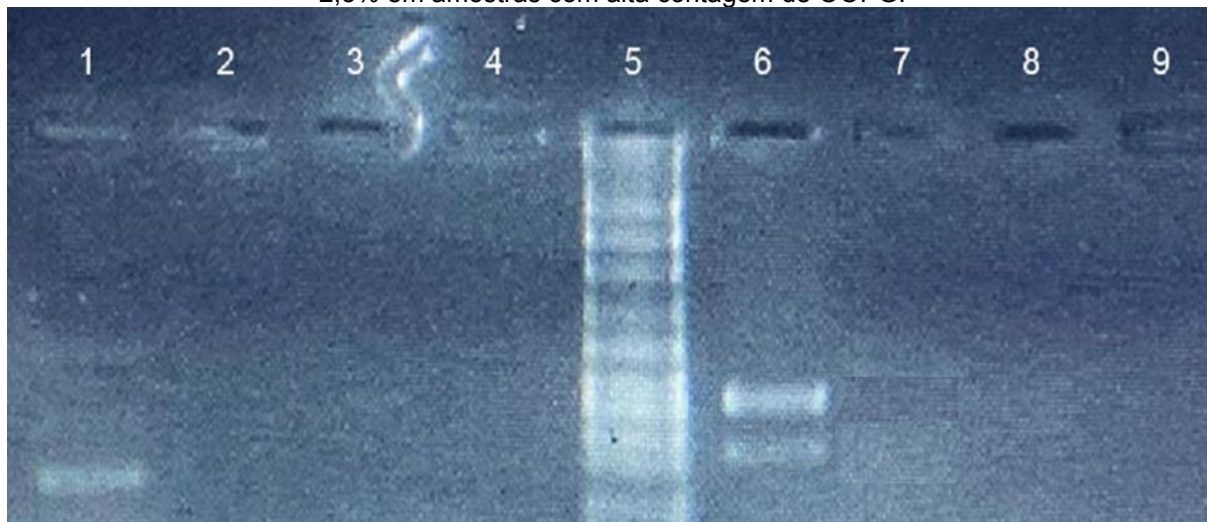
Para a determinação das espécies de *Eimeria* spp. nas amostras de campo, foram selecionadas 310 amostras de campo com OOPG acima de 5×10^3 , entre os aviários utilizados no experimento, mas que tivessem apresentado um valor de OOPG

superior a 5×10^3 oocistos por grama. A análise das primeiras 20 amostras, não identificou nenhuma positividade.

Com o resultado negativo da PCR, foram verificados todos os valores de OOPG e todas as amostras possuíam quantidade superior ao limite mínimo detectado no trabalho de referência, sendo que em uma destas o valor é próximo de 1×10^6 , muito superior ao utilizado para extração quando comparado com Tang et al. (2018). Enquanto para Carvalho et al. (2011), a amplificação foi realizada a partir de 20 oocistos.

Na expectativa de que as amostras de campo pudessem conter muito mais DNA bacteriano do que o de interesse, novos testes foram realizados, selecionando-se amostras com maior contagem de oocistos por grama de fezes (aproximadamente $1,7 \times 10^5$ OOPG). Também foram feitos testes com aumento do volume de amostra na reação de PCR, usando aumento progressivo de quantidade de amostra extraída (1,2,3 e 4 μ l), e o volume dos *primers* reduzido para 0,3 μ l (FIGURA 10).

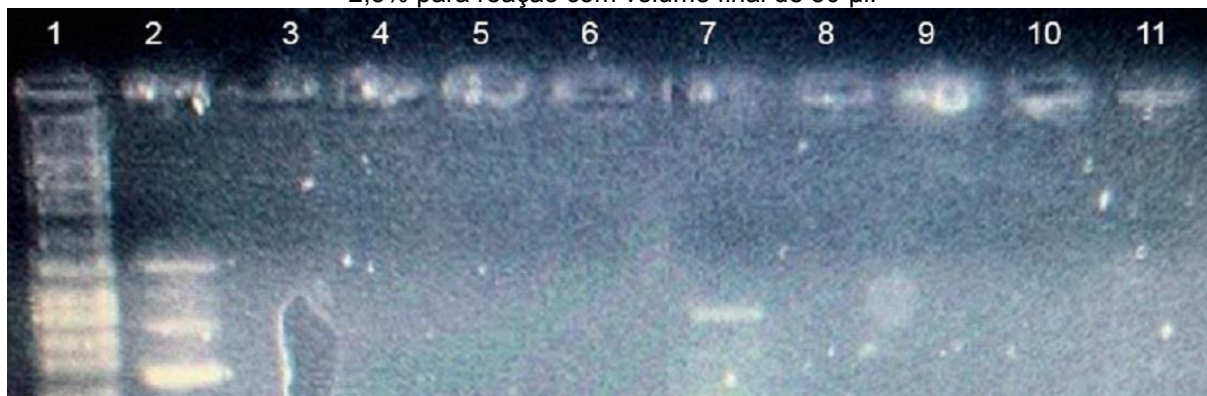
Figura 10 - Reação de PCR configurado com aumento do volume de amostra em gel de agarose à 2,5% em amostras com alta contagem de OOPG.



Legenda: Line 1 – C+ Multiplex 1 (*E. acervulina* - 811 pb, *brunetti* – 626 pb, *mitis* – 460 pb e *maxima* – 272pb); Line 2 a 4 – amostra para Multiplex 1; Line 5 marcador de peso molecular; Line 6 - C + Multiplex Mix 2 (*E. tenella* – 539 pb, *praecox* – 354 pb); Line 7 a 9 amostra para Multiplex 2.

Pode ser observado na amplificação do controle positivo, mas não das amostras testadas. Assim, outra modificação foi realizada com aumento de volume de amostra com 6,8,10 e 12 μ l respectivamente, e o volume dos *primers* ajustado para 0,5 μ l para uma reação de 50 μ l (FIGURA 11).

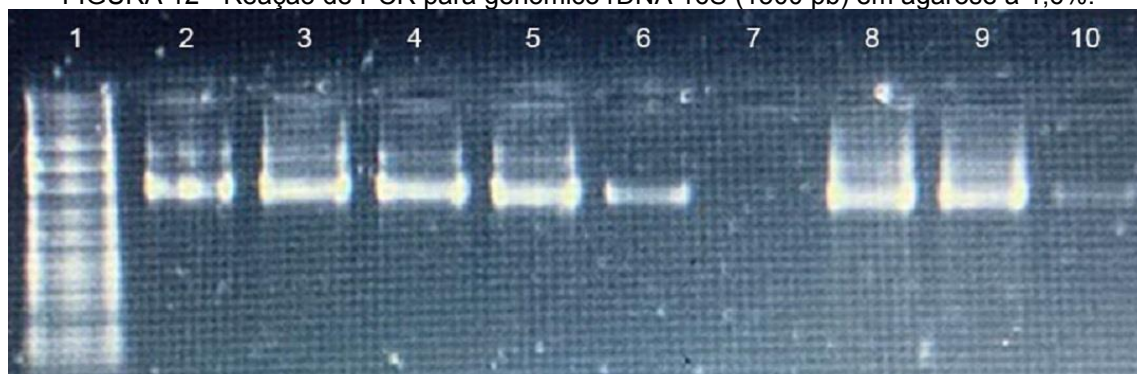
FIGURA 11 - Reação de PCR configurado com aumento do volume de amostra em gel de agarose à 2,5% para reação com volume final de 50 µl.



Legenda: Line 1 – marcador de peso molecular; Line 2 - C+ *Multiplex 1* (*E. acervulina* - 811 pb, *brunetti* – 626 pb, *mitis* – 460 pb e *maxima* – 272pb); Line 3 a 6 – amostra com 6, 8, 10 e 12 µl, respectivamente ; Line 8 - C + *Multiplex Mix 2* (*E. tenella* – 539 pb, *praecox* – 354 pb); Lines 9 a 12 - amostra com 6, 8, 10 e 12 µl, respectivamente.

Com o resultado as amostras foram então submetidas a quantificação de DNA total, através do Nanodrop® 2000, (260/280). Grande parte das amostras apresentou razão abaixo de 1, o que infere baixa qualidade no processo de extração. A pureza das amostras deve apresentar razão de pelo menos 1,8. Neste processo, a razão estabelecida para a amostra extraída da vacina comercial foi de 1,5 embora tenha demonstrado excelente resultado na eletroforese de padronização. O resultado ruim com as amostras de campo pode ter sido influenciado pela grande quantidade de matéria orgânica contida no material fecal. Com o resultado mensurado no Nanodrop® 2000, considerou-se como possibilidade presença de DNA bacteriano em excesso, o que poderia estar interferindo diretamente com a pequena quantia de DNA do protozoário impossibilitando o anelamento do material alvo. Assim optou-se por realizar PCR genômico das amostras com *primer 16S'* (*primer* de rDNA bacteriano - 1500 pb) em gel de agarose à 1%. As amostras utilizadas foram com menor grau de pureza (amostras 320,321,322 e 323) e com melhor grau de pureza (amostras 408, 420, 421, 434, 444). As reações foram ajustadas para 25µl, sendo: 12,5 Taq polimerase, 0,1 µl de cada *primer* F e R para região 16S, 1 µl de amostra e 11,3 µl de água livre de DNase.

FIGURA 12 - Reação de PCR para genômico rDNA 16S (1500 pb) em agarose a 1,6%.



Legenda: Line 1 - Marcador de peso molecular; Line 2 a 10 - Amostras avaliadas – 1500pb.

Pelo resultado obtido na leitura de pureza das amostras os resultados das amostras 320 a 323 apresentaram amplificação de material em altura de 1500 pb, peso compatível com material genético bacteriano, assim como as amostras 421 e 434. Das amostras com melhor qualidade de pureza apenas duas de quatro amostras amplificaram material 16S, o que alerta para inconsistência na leitura em Nanodrop®.

Normalmente as amostras de origem fecal estão sujeitas a muitas variáveis que podem dificultar a purificação, considerando-se variantes intrínsecas e extrínsecas. Os principais fatores intrínsecos são: degradação de DNA por ação de DNAses de origem bacteriana, grande quantidade de proteína da dieta, células de descamação da mucosa intestinal e bactérias; os fatores extrínsecos referem-se a: tempo e temperatura de estocagem e de manipulação e qualidade de materiais utilizados na execução da metodologia analítica (BUTLER, 2012). Amostras fecais apresentam grande quantidade de DNA bacteriano, uma vez que o ambiente intestinal contém microflora característica da espécie amostrada em grandes quantidades, assim aumenta a possibilidade de resultados falso-negativos (MALDONADO, 2008).

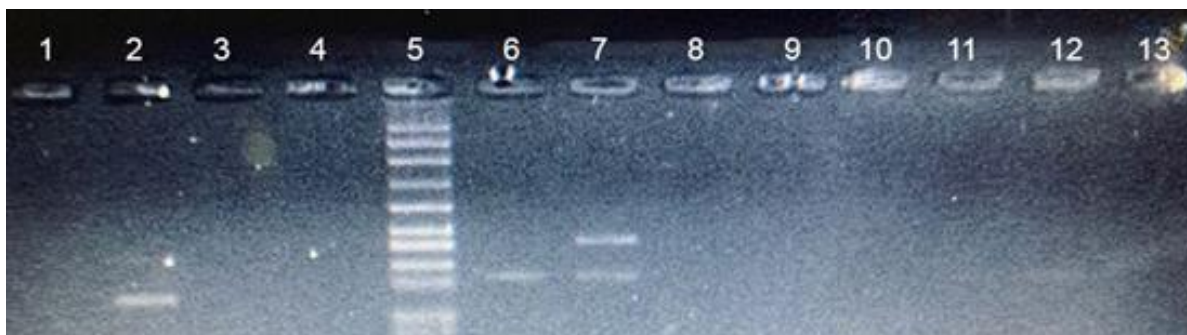
Na tentativa de melhorar a condição de extração de oocistos da amostra fecal, foi estabelecido novo protocolo, utilizando-se o princípio da flutuação da técnica de Willis-Molay. Foi selecionada uma amostra com alta contagem de OOPG ($2,4 \times 10^5$ oocistos). Foram pesadas cinco gramas de fezes, suspensas em 60ml de solução hipersaturada de NaCl ($d=1,18\text{g/cm}^3$) que permaneceu em repouso durante cinco minutos, para flutuação de oocistos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur foram recuperados cerca de 10 ml do sobrenadante, seguido de centrifugação a 2000g por dois minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescido de 4ml de NaCl 0,9%, homogeneizado em vórtex e novamente centrifugados a 3100g por 10 minutos. A cada etapa do processo foram colhidas alíquotas da amostra para visualização direta em

microscopia em magnificação de 100 vezes, e confirmação da presença de oocistos. Após a contagem aproximada de 20 oocistos de *Eimeria* spp. por campo observado em cada alíquota de 10µl, a amostra seguiu para a extração conforme propostos por Tang et al. (2018).

Como uma alternativa para o protocolo de extração, também foi realizada a técnica descrita por Osaki et al. (2009), ao trabalharem com a extração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. a partir de material decantado originado estações de tratamento de esgoto (ETAs). Para a extração as amostras foram purificadas em gradiente de Sacarose (1M), e realizada a purificação com auxílio do *Kit Comercial Charge Switch gDNA Mini Tissue Kit* (Thermofisher®).

A amplificação foi realizada em solução de 25 µl, com 17,5µl *Green Master Mix*, 0,5 µl para cada *primer* F e R, 1 µl da amostra e o restante em água livre de DNase. A eletroforese foi feita em gel de agarose à 2,5%. Das reações, apenas a extração realizada com o precipitado de oocistos de amostra com OOPG de $2,4 \times 10^5$ apresentou formação de bandas (line 6).

FIGURA 13 - Reação de PCR para processo de purificação modificada de amostras coletadas.



Legenda: Eletroforese em reação de agarose à 2,5% em reação de 25µl, com 0,5µl de *primer*, 1µl de amostra e alteração da configuração de *primers*. Line 1 – pellet de amostra de campo para mix 1; Line 2 – C+ *Multiplex 1* (*E. acervulina* - 811 pb, *brunetti* – 626 pb, *mitis* – 460 pb e *maxima* – 272pb); Line 3 – C – mix 1; Line 4 – sobrenadante de amostra de campo para mix 1; Line 5 – Marcador de peso molecular; Line 6 – pellet de amostra de campo para mix 2; Line 7 - C + *Multiplex Mix 2* (*E. tenella* – 539 pb, *praecox* – 354 pb); Line 8 – Controle negativo mix 2; Line 9 – sobrenadante de amostra de campo para mix 2; Line 10 a 13 – amostras de campo processadas conforme Osaki, (2009).

Houve amplificação de material genético compatível com banda para *E. praecox* (354 pb), somente para a amostra que foi purificada e extraída com o novo método de recuperação de oocistos (line 7) com a extração descrita em Tang et al. (2018).

5. CONCLUSÃO

O tratamento utilizado com melhor eficácia foi a fermentação, mantendo o menor OOPG no período avaliado. O uso apenas da fermentação ou da calagem obtiveram melhor resultado reduzindo o pico de eliminação de oocistos com menor atividade do protozoário.

Tratamentos individuais bem executados tem capacidade de reduzir a contaminação da cama, e a troca em períodos curtos não necessariamente reduz os problemas com contaminantes. A associação dos tratamentos além de não trazer melhores resultados, demanda maior mão de obra e incremento nos custos para a produção.

O processo de extração proposto ainda precisa de modificações quanto à sua recuperação de oocistos para que seja considerado como uma possibilidade de ferramenta na rotina. A padronização da técnica de PCR Multiplex precisa de melhorias, quando se considera como ferramenta de uso a campo para se determinar as espécies circulantes.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle sanitário da cama é ferramenta fundamental no controle da coccidiose ao longo de sucessivos lotes e está sujeita a interação entre o hospedeiro e a *Eimeria* spp. e outros fatores como lote, idade, tratamento e suas interações. O uso de apenas um tratamento, especialmente a fermentação, demonstra ser mais eficiente do que a associação dos tratamentos para o controle da *Eimeria* spp. além de simplificar o manejo e ser de baixo custo.

A PCR Multiplex como técnica de identificação das espécies demonstrou ser eficiente como observado na extração da vacina para obtenção do controle positivo. Amostras fecais coletadas do campo requerem nova metodologia para purificação e recuperação de oocistos na busca de resultados promissores.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z.; IQBAL, Z.; KAHN, A.; SINDHU, Z. U. D. KHAN, J. A.; KHAN M. N.; RAZA, A. **International Journal of Agriculture and Biology**. Paquistão, v. 14, n. 6, p. 1014-1020. 2012. Disponível em: http://www.fspublishers.org/published_papers/3693..pdf. Acesso em: 20/08/2019.

ADHIKARI, P. et al. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. **Journal of Applied Poultry Research**, Savoy, Fevereiro de 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105661711932241X>. Acesso em: 14/02/2020. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.11.005>.

AKANBI, Olatunde B. et al. The effect of a local isolate and Houghton strain of *Eimeria tenella* on clinical and growth parameters following challenge in chickens vaccinated with IMMUCOX® and LIVACOX® vaccines. **Journal of Parasitology Diseases**, Nova Iorque. v. 44, n. 1, Fevereiro de 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339075121_The_effect_of_a_local_isolate_and_Houghton_strain_of_Eimeria_tenella_on_clinical_and_growth_parameters_following_challenge_in_chickens_vaccinated_with_IMMUCOXR_and_LIVACOXR_vaccines_Journal_of_Parasitology. Acesso em: 26/02/2020. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01202-y>

ALLEN, P. C.; FETTERER R. H. Recent Advances in biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 15, n. 1, p. 58-65. Janeiro de 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781266>. Acesso em: 07/03/2020. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.1.58-65.2002>.

ARAKAWA, A.; BABA, E.; FUKATA, T. *Eimeria tenella* Infection Enhances *Salmonella typhimurium* Infection in Chickens. **Poultry Science**, Amsterdã, v. 60, n. 10, p. 2203-2209, Fevereiro de 1981.

ASSIS, R. C. L. **Eficiência de diferentes métodos de controle sobre oocistos de *Eimeria acervulina* na cama reutilizada de frangos de corte**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e parasitologia aplicadas) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, Fevereiro de 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16640>. Acesso em: 10/04/2020.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). **Relatório Anual 2020**. São Paulo.

AVILA, V.S.; ABREU, V.M.N.; FIGUEIREDO, E.A.P.; OLIVEIRA, U.; BRUM, P.A. Valor agrônomo da cama de frango após reutilização por vários lotes consecutivos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves (2007). Embrapa Suínos e Aves. Comunicado técnico, 46.

BARBOSA, A. C. O. F. **Avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de primers para otimização de sistemas Multiplex de genotipagem.** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia, da Universidade Federal do Goiás, Janeiro de 2010. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1291>. Acesso em: 22/04/2020.

BARTA, J. R. et al. Analysis of infraspecific variation among five strains of *Eimeria maxima* from North America. **International Journal for Parasitology**. Amsterdã, v. 48, n. 3, p. 485-492, Março de 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9559366>. Acesso em: 05/02/2020. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00211-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00211-7).

BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. Campinas: Facta, 2009.

BUTLER, J. M. **Degraded DNA**. p. 293-309. In__: Advanced Topics in Forensic DNA Typing: methodology. p. 680, ed. Academic Press, China, 2012.

BRASIL. **Instrução Normativa N. 14, de 6 de Julho de 2016**. Institui o Regulamento Técnico sobre os Procedimentos para a Fabricação e o Emprego de Produtos Destinados à Alimentação Animal com Medicamentos. Brasília, DF, n. 130, 08 de jul. 2016. Seção 1, p. 4.

BRASIL. **Instrução Normativa N. 56, de 6 de Dezembro de 2007**. Institui os Procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução, comerciais e de ensino ou pesquisa. Brasília. 06 de dez. de 2007. Seção 1, p. 11.

BRASIL. **Instrução Normativa N. 17, de 7 de Abril de 2006**. Aprovar, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade Avícola, o Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle em todo o território nacional. Brasília, DF, n. 69. 7 de abr. 2006. Seção 1, p. 2.

CASTAÑON, César Armando Beltrán et al. Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. **Pattern Recognition**. Amsterdã, v. 40, n. 7, p. 1899-1910, Julho de 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031320306005206#!>. Acesso em: 21/08/2018. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2006.12.006>

CARVALHO, F. S. Molecular Diagnosis of *Eimeria* species affectin natyrally infected *Gallus gallus*. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 996-1005, Maio de 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/908376>. Acesso em: 01/04/2019. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1043>.

CHAPMAN, H. D. Applied strategies for the control of coccidiosis in poultry. **Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources**.

Reino Unido, v 13, n. 26, p. 1-11, Julho de 2018. Disponível em: <https://www.cabi.org/cabreviews/abstract/20183254614> .Acesso em: 04/09/2018. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201813026>.

CHAPMAN, H. D. et al. The epizootiology of *Eimeria* infections in commercial broiler chickens where anticoccidial drug programs were employed in six successive flocks to control coccidiosis. **Poultry Science**. Amsterdã v. 1, n. 95. p. 1774-1778, Abril de 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053624>. Acesso em: 13/02/2020. <https://doi.org/10.3382/ps/pew091>

CHAPMAN, H. D. Biochemical, genetic, and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. **Avian Pathology**. Reino Unido, v. 26, n. 2, p. 221-244, 1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483904>. Acesso em: 05/09/ 2018. <https://doi.org/10.1080/03079459708419208>.

CHAPMAN, H. D. Sensivity of field isolates of *Eimeria tenella* to anticoccidial drugs in the chicken. **Research in Veterinary Science**. Amsterdã, v. 47, n. 1, p. 125-128, Julho de 1989.

CHASSER, K. M. et al. Research Note: Evaluating fecal shedding of oocysts in relation to body weight gain and lesion scores during *Eimeria* infection. **Poultry Science**. Amsterdã, v. 99, n. 2, p. 886-892, Fevereiro de 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119441874>. Acesso em: 20/02/2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.028>.

COSTA, C. A. F. et al. Coccidiosis and performance in broilers with anticoccidial medicated feed starting at different ages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 52, n. 2 p. 144-149, Abril de 2000. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000200010&lng=en&tlng=en. Acesso em: 02/05/2020. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352000000200010>.

DeJONG, Ingrid C. et al. Wet litter not only induces footpad dermatitis but also reduces overall welfare, technical performance, and carcass yield in broiler chickens. **Poultry Science Association**. Champaign, v. 23, n. 1, p. 51-58, Março de 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056617119303617>. Acesso em: 12/03/2020. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00803>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA (EMBRAPA). Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 25/03/2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA (EMBRAPA). Biossegurança e Cuidados Sanitários para Frangos, Concórdia, Santa Catarina, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA (EMBRAPA). Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/SP/aves/Biosseguridade.html>. Acesso em: 22 de jun. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA (EMBRAPA). Reutilização da Cama na Criação de Frangos e as Implicações de Ordem Bacteriológica na Saúde Humana e Animal, Concórdia, Santa Catarina, Junho de 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA (EMBRAPA). Água na Avicultura: Importância, Qualidade e Exigências, Concórdia, Santa Catarina, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA (EMBRAPA). Tecnologias que Promovem a Biossegurança na Produção Avícola, Concórdia, Santa Catarina, 2012.

FILHO, J. I. S.; TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, F. Conjuntura econômica da Avicultura Brasileira. **Anuário da Avicultura Industrial**. Itu, v. 1294, n. 11/2019, p.14-17, Novembro de 2019.

FINGER A. MICHAEL A. Maternal protection against Eimeria challenge of CoxAbic(r) vaccinated chickens. Proceedings of the 9th International Coccidiosis Conference; 2005; Foz do Iguaçu, Paraná. Brasil. p. 146.

FREITAS, F. L.; ALMEIDA, K. S.; NASCIMENTO, A. A.; TEBALDI, J. H.; MACHADO, R. Z.; MACHADO, C. R. Aspectos clínicos e patológicos em frangos de corte(*gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* TYZZER, 1929. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 16-20, Março 2008.

GARCÉS-GUDIÑO, J. et al. Litter reuse reduces Eimeria spp oocyst counts and improves the performance in broiler chickens reared in a tropical zone in Ecuador. **European Poultry Science**. Amsterdã, v. 82, n. 1, p. 1-9, Outubro de 2017. Disponível em: <https://www.european-poultry-science.com/Litter-reuse-reduces-span-classws-name-Eimeria-sppspan-oocyst-counts-and-improves-the-performance-in-broiler-chickens-reared-in-a-tropical-zone-in-Ecuador,QUIEPTU2ODUxNDMmTUIEPT2MTUxNQ.html>. Acesso em: 26/03/2020. <https://doi.org/10.1080/0307945970841920810.1399/eps.2018.220>.

GAZONI, Fábio Luis et al. Correlation between intestinal health and coccidiosis prevalence in broilers in Brazilian agroindustries. **Parasitology International**. Amsterdã. v.76, n.1 p. 1-5, Novembro de 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576919303782>. Acesso em: 03/02/2020. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.102027>.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V.A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Council of Science and Industry Research**, Australia, v.12, n.1. p. 50-52, 1939.

HERNANDES, R.; CAZETTA, J.O. Método simples e acessível para determinar amônia liberada pela cama aviária. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.824-829, 2001. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982001000300030. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000300030>.

HONG, Y.H. H.S. LILLEHOJ, S.H. LEE, R.A. DALLOUL AND E.P. LILLEHOJ. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following Eimeria acervulina and

Eimeria tenella infections. **Veterinary Immunology Immunopathology**. Amsterdã, v. 114, n. 1, p. 209-223, Dezembro de 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996141>. Acesso em: 08/03/2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.07.007>

IRFAN, Muhammad et al. Effect of different bedding materials on growth performance, physiological response and economic efficiency in three commercial broiler strains. **Indian Journal of Animal Sciences**. Índia, v. 53, n. 4, p. 545-550, Outubro de 2017. Disponível em: <https://arccjournals.com/journal/indian-journal-of-animal-research/B-795>. Acesso em: 11/03/2020. Endereço DOI: <https://doi.org/10.18805/ijar.B-795>.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: Lesion Scoring technique in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**. Amsterdã, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JUNIOR, A. SILVA, E.N; FÁBIO, E.D.I.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. Doenças das aves. 2ª ed. Campinas-SP: FACTA, 2009, p. 837-855.

KELLEHER, B. P. et al. Advances in Poultry Litter Disposal Technology--A Review. **Bioresource Technology**. V. 83, n. 1, p. 27-36, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12058828/>. Acesso em: 29/05/2020. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00133-X).

KIM, Woo et al. Immunity, immunomodulation, and antibiotic alternatives to maximize the genetic potential of poultry for growth and disease response. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdã, v. 250, n. 1, p. 41-50. Abril de 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840118301858>. Acesso em: 05/02/2020. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.09.016>.

LEW, A. E.; ANDERSON, G. R.; MINCHIN, C. M.; JESTON, P. J.; JORGENSEN W. K. Inter and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. **Veterinary Parasitology**. Madison, v. 112, n. 1-2, p. 33-50, Fevereiro de 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581583>.

LILLEHOJ, H. S.; RUFF, M. D. Comparison of disease susceptibility and subclass-specific antibody response in SC and FP chickens experimentally inoculated with *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, or *E. maxima*. **Avian Diseases**. Jacksonville, v. 31, n. 1, p. 112-119, Janeiro de 1987. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/1590782?origin=crossref>. Acesso em: 25/10/2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00772-18>

MacDONALD, Sarah E. Impact of *Eimeria tenella* Coinfection on *Campylobacter jejuni* Colonization of the Chicken. **Infection and Immunity**. Washington, v. 87, n. 2, p. 1-12, Fevereiro de 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6346136/>. Acesso em: 03/02/2020. Endereço DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00772-18>.

MALDONADO, A. G. Ocorrência de *Salmonella* sp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. 2008. 75p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-20022009-175042/pt-br.php>. Acesso em: 12/05/2020.

MARTINS, Guilherme Felippelli et al. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 33, n. 3, p. 1165-1175, Maio/Junho de 2012. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744113040>. Acesso em: 14/01/2020. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n3p1165>.

MORAES, Julio César et al. Prevalence of *Eimeria* spp. in Broilers by Multiplex PCR in the Southern Region of Brazil on Two Hundred and Fifty Farms. **Avian Diseases**. Jacksonville, v. 59, n. 2, p. 277-281, Fevereiro de 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473679>. Acesso em: 05/06/2019. <https://doi.org/10.1637/10989-112014-Reg>.

MORRIS, G. M. GASSER, R. B. Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. **Biotechnology Advances**. Amsterdã, v. 24, n. 6, p. 590-603, Junho de 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901674>. Acesso em: 26/10/2018. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.06.001>.

MUNIR, M. T et al. Wood-based litter in poultry production: a review. **World's Poultry Science Journal**. Amsterdã, v. 75, n. 1, p. 5-16, Março de 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/woodbased-litter-in-poultry-production-a-review/37475BDF5E9938629E59FEB55DDC6C3E>. Acesso em: 11/03/2020. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000909>.

OSAKI, S. C. *Cryptosporidium* spp.: Desenvolvimento de técnicas moleculares e imunoquímicas para a detecção de oocistos em água e avaliação da sua remoção pelos métodos convencionais de tratamento da água. 2009. 175 f. (Doutorado em Processos biotecnológicos, com concentração em Saúde Humana e Animal) - Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/23048>. Acesso: 10/04/2020.

Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). Technical Workshop on Residues of Veterinary Drugs with ADI/MRL. 24 a 26 de Agosto de 2004, Bangkok, Tailândia.

PACE, M.G.; MILLER, B.E.; FARRELL-POE, K.L. The composting process. **USU Extension fact sheet**, AG-WM 01. Logan, UT: USU (1995).

PEEK, H. W. LANDMAN, W. J. M. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. **Veterinary Quarterly**. Reino Unido, v. 31, n. 3, p. 143-161, Setembro de 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/01652176.2011.605247>. Acesso em: 26/09/2018. Endereço <https://doi.org/10.1080/01652176.2011.605247>.

POP, Loredana Maria et al. Efficacy of a commercial herbal formula in chicken experimental coccidiosis. **Parasites & Vectors**. Londres, v. 12, n. 1, p. 343-352, Julho de 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6624883/>. Acesso em: 27/03/2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3595-4>.

REGMI P. et al. Effects of different litter substrates and induced molt on production performance and welfare quality parameters of white Leghorn hens housed in multi-tiered aviary system. **Poultry Science**. Amsterdã, v. 97, n. 10, p. 3397-3404, Abril de 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29878244>. Acesso em: 11/03/2020. <https://doi.org/10.3382/ps/pey211>.

RIMET, Claire-Sophie et al. The Contribution of Eimeria Coinfection and Intestinal Inflammation to Cecal Colonization and Systemic Spread of Salmonella Typhimurium Deficient in Tetrathionate Reductase or Type III Secretion Systems Salmonella Pathogenicity Island 1 or 2. **Avian Diseases**. Jacksonville, v. 56, n. 4, p. 559-567, Junho de 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31865669>. Acesso em: 03/02/2020. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-19-00082>.

RITZ, C.W.; FAIRCHILD, B.D.; LACY, M.P. Litter quality and broiler performance. Cooperative Extension Service-The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences. Bulletin (2009) 1267.

ROLL, V. F. B. et al. Broiler breeder microbiological litter condition following treatment with Impact P®. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2650-2653. Dezembro de 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000900042. Acesso em: 15/01/2020. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000006>.

SAS. **SAS Software**. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc. 2004.

SAMBROOK, J. FRITCSH, E. F. MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2. Ed. Nova Iorque. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS FILHO, J. I.; TALAMINI, D. J. D.; MARTINS, F. Conjuntura Econômica da Avicultura Brasileira. **Anuário 2020 da Avicultura Industrial**. ed. 1294, Porto Alegre: Gessulli, n.11, p. 14-20, 2019.

SCHNITZLER, B.E.; THEBO, P.L.; MATTSSON, J.G.; TOMLEY, F.M.; SHIRLEY, M.W. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic Eimeria species of the chicken. **Avian Pathology**, Reino Unido, v. 27, p.490-497, 1998.

SILVA, V. S.; VOSS, D.; COLDEBELLA, A.; BOSETTI, N.; AVILA V. S. Efeito de Tratamentos Sobre a Carga Bacteriana de Cama de Aviário Reutilizada em Frangos de Corte. Comunicado Técnico. Versão Eletrônica, Concórdia, SC. 2007. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/busca-de-publicacoes/->

[/publicacao/435829/efeito-de-tratamentos-sobre-a-carga-bacteriana-de-cama-de-aviario-reutilizada-em-frangos-de-corte](#). Acesso em: 29/05/2020.

TANG, Xiaoli et al. Na optimized DNA extraction method for molecular identification of coccidian species. **Parasitology Research**. Alemanha, v. 117, n. 1, p. 655-664, Fevereiro de 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-017-5683-8>, Acesso em: 14/03/2019. <https://doi.org/10.2307/1590810>.

TASISTRO, A. S. et al. Ammonia emissions from broiler litter: responde to bedding materials na acidifiers. **British Poultry Science**. Inglaterra, v. 48, n. 4, p. 399-405, Agosto de 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071660701473865?journalCode=cbps20>. Acesso em: 11/03/2020. <https://doi.org/10.1080/00071660701473865>.

TOROK, V. A et al. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. **Poultry Science**. Amsterdã, v. 88, n. 12, p. 2474-2481. Dezembro de 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257911944786X>. Acesso: 09/03/2020. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00381>.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; JENNINGS, F.W. In Protozoologia Veterinária. **Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998. p. 196-203.

WALLACH, Michael. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. **Trends in Parasitology**. Londres, v. 26, n. 8, p.382-387, Agosto de 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S147149221000067X>. Acesso em: 17/02/2020. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.004>.

WEPPELMAN, R. M. et al. Comparison of anticoccidial efficacy, resistance and tolerance of narasin, monensin and lasalocid in chicken battery trials. **Poultry Science**. Amsterdã v. 56, n. 5, p. 1550-1559, setembro de 1977. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/605098>. Acesso em: 08/02/2020. <https://doi.org/10.3382/ps.0561550>

WILLIAMS, R. B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosi to the world's chicken production industry. **International Journal for Parasitology**, Amsterdã, v. 29, n. 8, p. 1209-1229, Maio de 1999.

WILLIAMS, R. B. Quantification of the crowding effect during infection with the seven *Eimeria* species of the domestical fowl: its importance fro experimental designs and the production of oocyst stocks. **International Journal for Parasitology**, Amsterdã, v. 31, n. 10, p. 1056-1069. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901002351>. Acesso em: 12/05/2020. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00235-1)

YOU, M. Detection of four important *Eimeria* species by Multiplex PCR in a single assay. **Parasitology International**. Amterdã, v. 63, n.3, p. 527-532, fevereiro de 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495953>. Acesso em: 05/06/2019. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.01.006>.

ZHANG, Jian Jun et al. Investigation into the prevalence of coccidiosis and maduramycin drug resistance in chickens in China. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 191, n.1-2, p. 29-34, agosto de 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925822>. Acesso em: 20/11/2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.027>.

ZHAO, Huanzhi et al. Molecular characterization and immune protection of an AN1-like zinc finger protein of Eimeria tenella. Parasitology Research. v. 119, p. 623-635. 22 de Novembro de 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-019-06545-x>. Acesso em: 15/04/2020. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06545-x>.

ZULPO, Dauton Luiz et al. Patogenicidade e observações histopatológicas de frangos de corte infectados experimentalmente com isolados de Eimeria tenella, E. acervulina e E. maxima. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 28, n. 1, p. 97-104. Março de 2007. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2566>. Acesso em: 20/04/2020. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n1p97>.